GE Healthcare
Life Sciences

Biacore

Biacore T200

version 2

Instrument Handbook

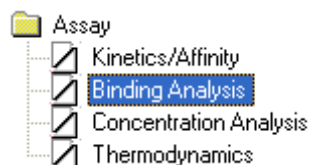
日本語取扱説明書
応用編

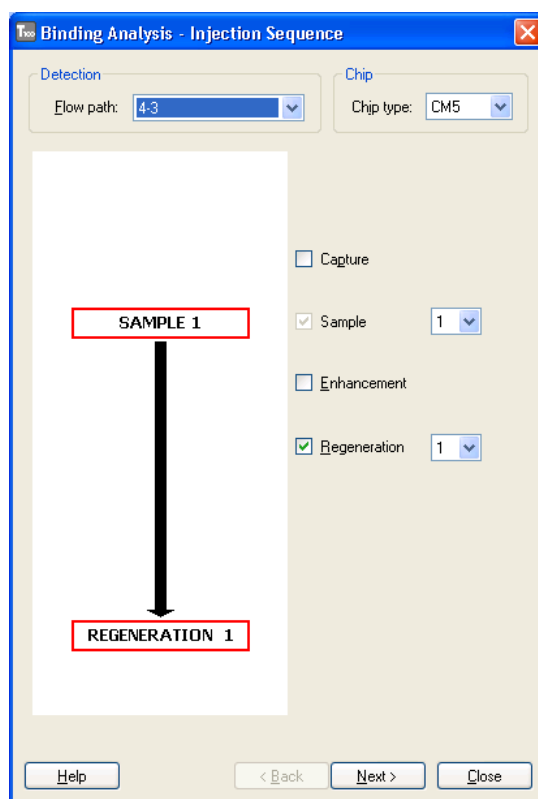
71-3416-34

目次

1. 結合の有無の確認、スクリーニング

1-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard** をクリックします。

Assay → **Binding Analysis** を選択した後、**New** をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open** をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse** をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open** をクリックします。なお、低分子化合物のスクリーニングやキャプチャー法でキャプチャー分子が複数種類ある場合には、メソッドを利用します。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　　目的のフローセルを設定します。
リファレンスの差し引き機能を利用してください。キャプチャー法を利用する場合、差し引き機能として 2-1 または 4-3 のみの選択となります。

Chip

Chip type　　利用するセンサーチップを選択します。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされます。

Sample

アナライトの添加。複数サンプルの連続添加は、補足 1-1 を参照してください。

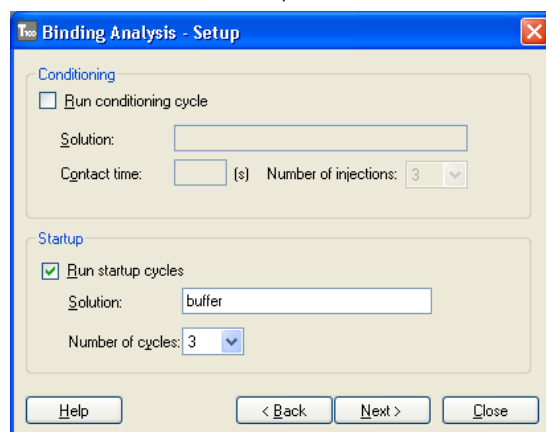
Enhancement

2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れます。

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数を選択します。（1 or 2）

入力後、**Next** をクリックします。

↓

ダミーランサイクルを設定します。

Startup

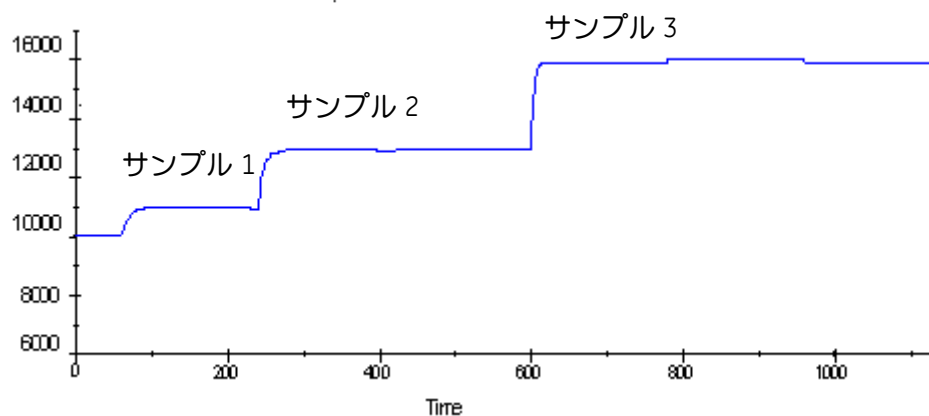
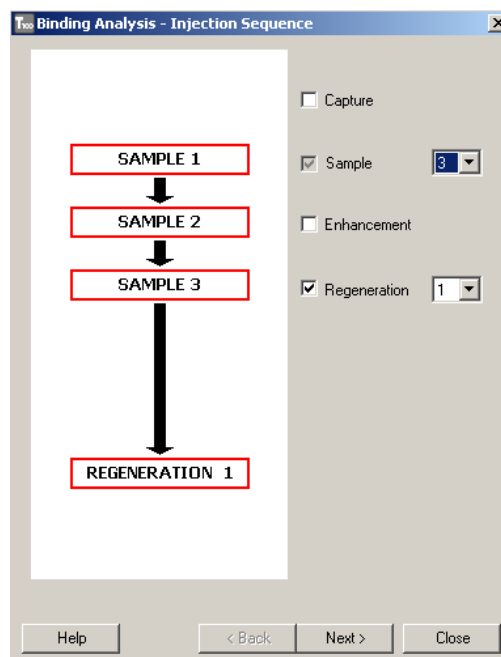
Solution　　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施します。通常は、ランニング緩衝液を用います。

Number of cycles　　サイクル数。3 回以上を推奨します。

Next をクリックします。

↓

補足 1-1. 複数サンプルの連続添加

エピトープマッピング等多段階の相互作用を検証する場合は、Sample 右のカラムで添加サンプル数を選択します。最大 4 サンプルまでの添加が可能です。

Sample

contact time	アナライトの添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Dissociation time	解離時間（s）

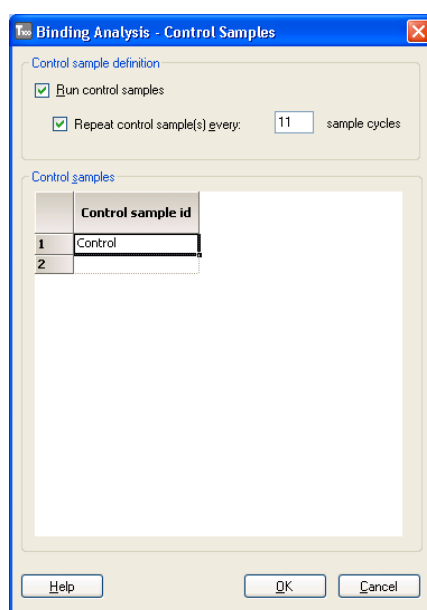
Regeneration

Solution	再生溶液の名称
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合は選択します
contact time	再生溶液の添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Stabilization period	添加後のベースラインの安定化時間（s）

設定後、**Next** をクリックします。

↓

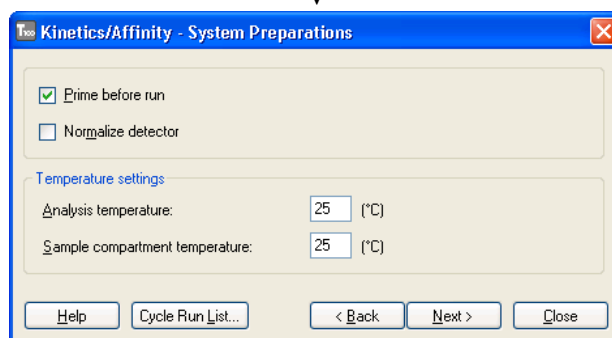
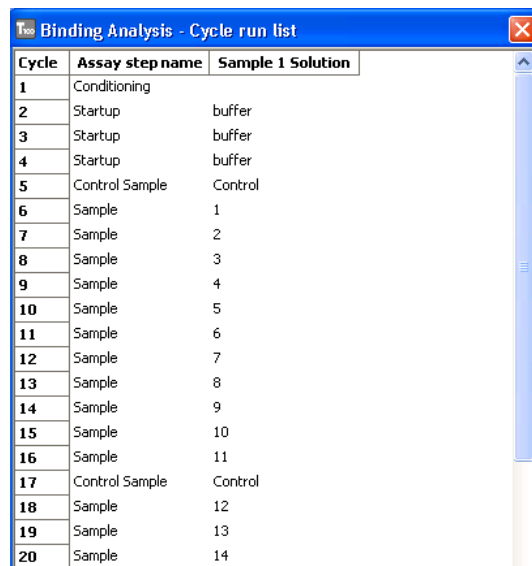
Sample id　　アナライトの名称を入力します。入力した順番で測定します。

コントロールサンプルを定期的に添加する場合は、**Control Samples** をクリックします。

Repeat Control Sample(s) every　　何サンプル毎にコントロールサンプルを測定するか入力します。入力後、OK をクリックします。

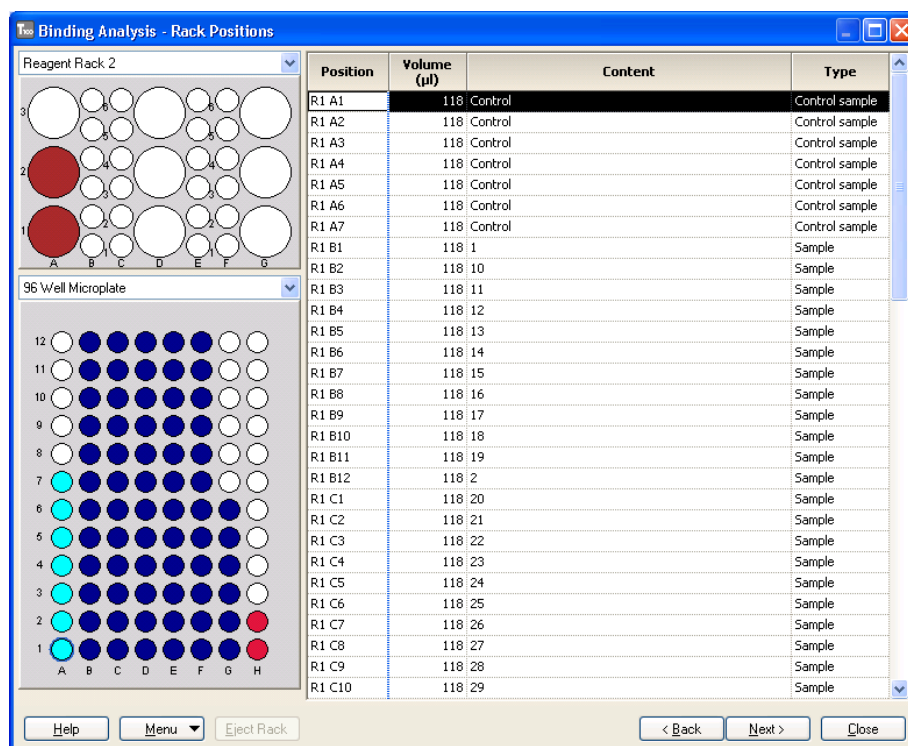
ポジティブコントロール、ネガティブコントロールを使用した各種補正を行う場合には、必ずコントロールサンプルを定期的に測定してください。

Next をクリックします。

補足 1-2. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力してください。

↓

測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

Analysis temperature	25℃
Sample compartment temperature	25℃

サイクルの測定順番を確認したい場合には、**Cycle Run List** をクリックします。

Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution
1	Conditioning	
2	Startup	buffer
3	Startup	buffer
4	Startup	buffer
5	Control Sample	Control
6	Sample	1
7	Sample	2
8	Sample	3
9	Sample	4
10	Sample	5
11	Sample	6
12	Sample	7
13	Sample	8
14	Sample	9
15	Sample	10
16	Sample	11
17	Control Sample	Control
18	Sample	12
19	Sample	13
20	Sample	14

Next をクリックします。

↓

Position	Volume (µl)	Content	Type
R1 A1	118	Control	Control sample
R1 A2	118	Control	Control sample
R1 A3	118	Control	Control sample
R1 A4	118	Control	Control sample
R1 A5	118	Control	Control sample
R1 A6	118	Control	Control sample
R1 A7	118	Control	Control sample
R1 B1	118	1	Sample
R1 B2	118	10	Sample
R1 B3	118	11	Sample
R1 B4	118	12	Sample
R1 B5	118	13	Sample
R1 B6	118	14	Sample
R1 B7	118	15	Sample
R1 B8	118	16	Sample
R1 B9	118	17	Sample
R1 B10	118	18	Sample
R1 B11	118	19	Sample
R1 B12	118	2	Sample
R1 C1	118	20	Sample
R1 C2	118	21	Sample
R1 C3	118	22	Sample
R1 C4	118	23	Sample
R1 C5	118	24	Sample
R1 C6	118	25	Sample
R1 C7	118	26	Sample
R1 C8	118	27	Sample
R1 C9	118	28	Sample
R1 C10	118	29	Sample

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

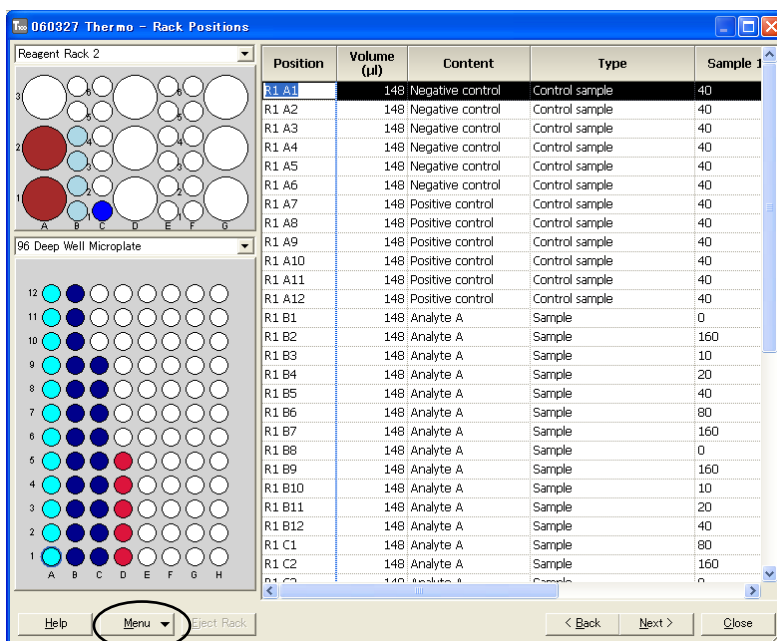
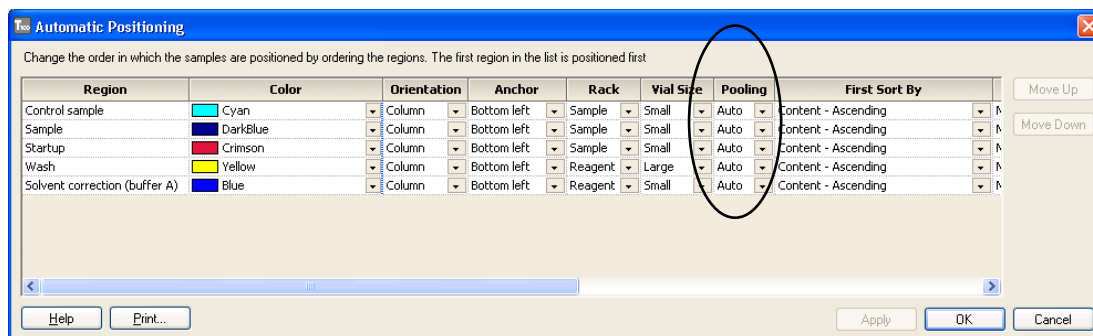
補足 1-3. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

補足 1-4. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。

Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓

ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定を行うことができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。
同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の **Next** をクリックします。

↓

Immobilization pH Scouting - Prepare Run Protocol

Tahoma 10 B I U

Prepare Run Protocol

- Make sure the correct sensor chip is docked.
- Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
- Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
  Note! Standby after run will use buffer A.
- Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
- If necessary, empty the waste bottle before start of the run.

Estimated run time: 18 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)

Estimated buffer consumption:

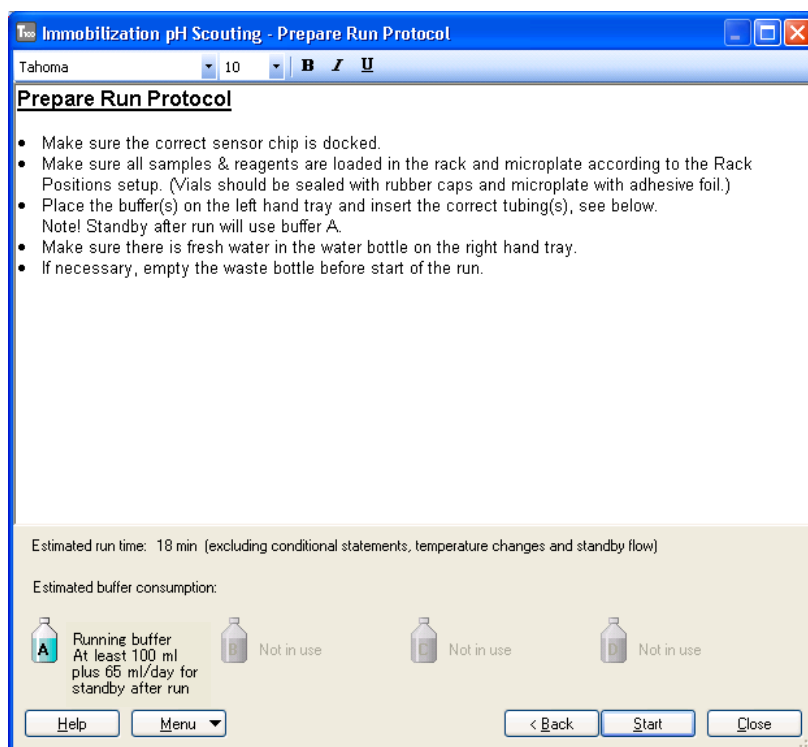
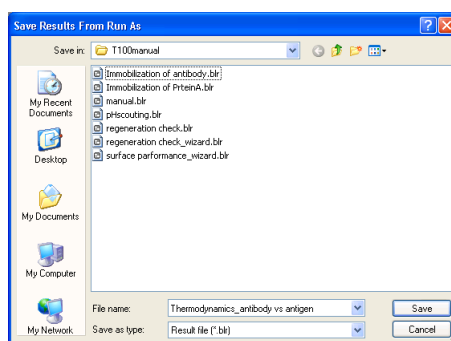
A Running buffer At least 100 ml plus 65 ml/day for standby after run　B Not in use　C Not in use　D Not in use

Help　Menu　< Back　Start　Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。
保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定が開始します。

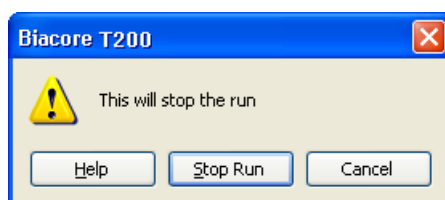
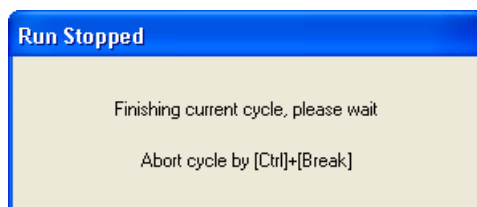
↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 1-5. プログラムの緊急停止

Run → **Stop Run** をクリックします。

ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

1-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行されます。

補足 1-6. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。
リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。

補足 1-7. 画面の説明

Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

複数の測定データファイルの同時解析

同一条件で測定した、複数の測定データを一括して解析したい場合には、解析前に全ての解析したいデータファイルを呼び込みます。最大 5,000 サンプル（1 濃度シリーズ, data correction rate;1Hz）を同時に解析できます。

File > Append Result File を選択後、追加したいファイル名を選択します。この操作を繰り返してデータの追加を行います。溶媒補正が必要な場合には、すべてのデータを呼び込んだ後に、**Solvent Correction** を実施します。

プロットを使用した Quality Control（QC）

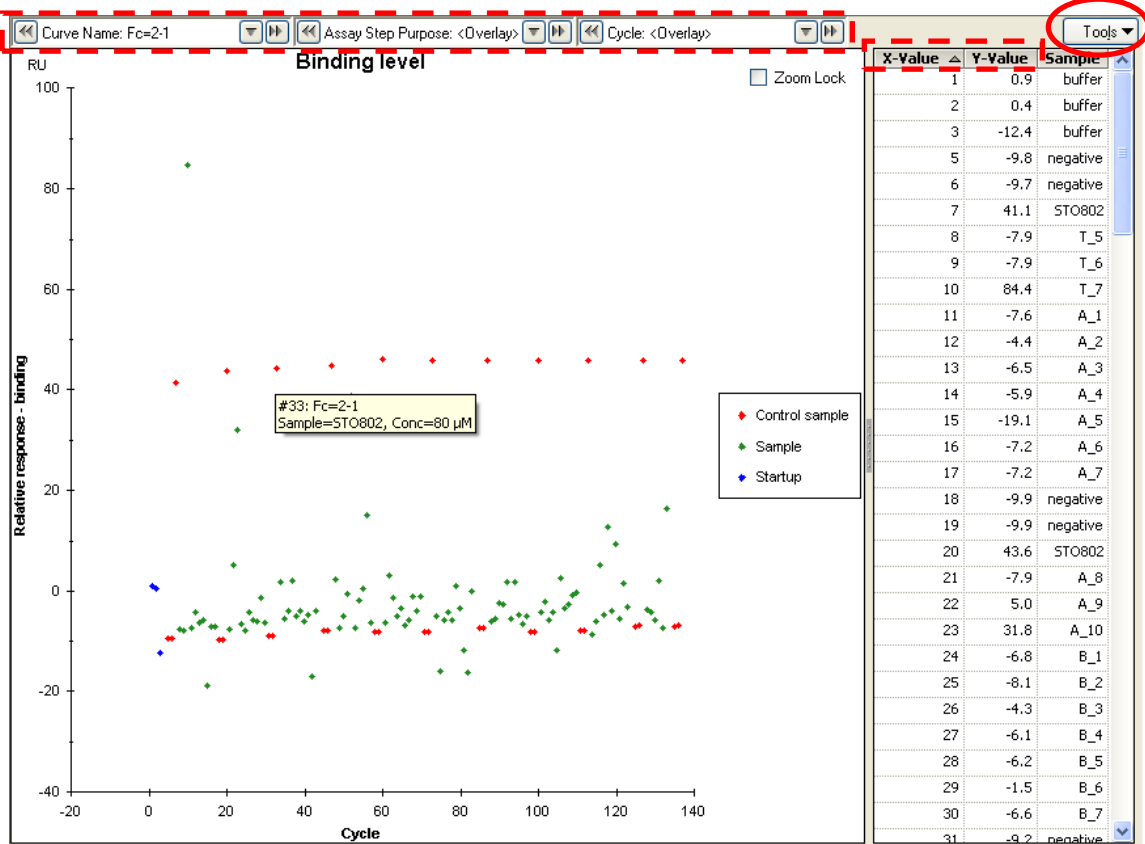
解析用プロット（Result Plot）作成前に、自動作成された Plot または作成した QC Plot を使用して解析に持ち込むデータの選択を行います。乱れているデータや、解析に持ち込まないデータの選択を行うことができます。この段階で Exclude したデータは、Result Plot には持ち込まれません。

画面左の Plot フォルダ内に、各種 Plot があります。自動取得されたレポートポイントでプロットが作成されます。（測定条件によって内容は異なります。）

（例）

Baseline: Sample ：ベースライン変動
Binding level ：“binding”のプロット
Binding stability ：“stability”のプロット
Binding to reference ：リファレンスセルでの“stability”のプロット
Carry-over ：キャリーオーバーチェックの“co_binding”のプロット
Controls, binding ：コントロールサンプルの“binding”のプロット
Controls, stability ：コントロールサンプルの“stability”のプロット

各 Plot を確認して、乱れがあるプロットや解析に持ち込まないプロットを確認します。

各 Plot の表示方法について Binding level の Plot で紹介します。

データの選択

プロット上部の Curve Name: Fc=2-1 のもしくはをクリックし、評価したいデータを選択します。

Assay Step Purpose: <Overlay> で、Assay Step でデータの抽出ができます。

Cycle: <Overlay> で、表示したいサンプルを個別に選択することができます。

プロットのポイントにマウスを移動すると、サンプル情報を確認できます。

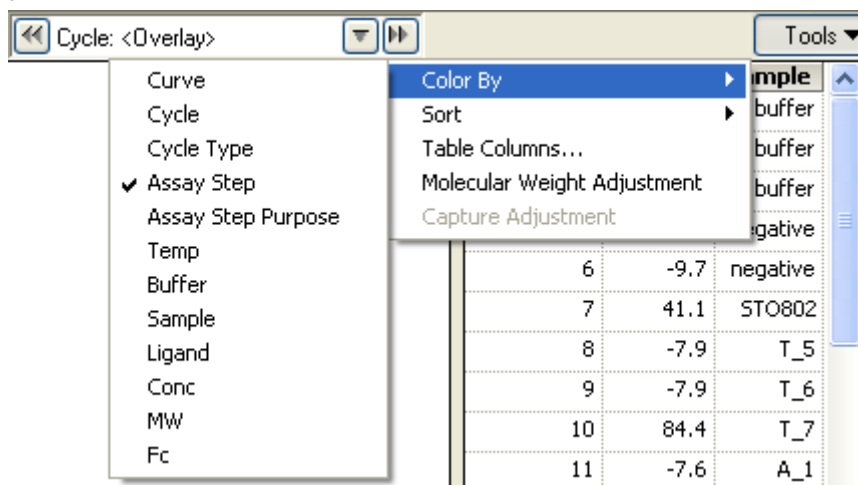
プロットの並べ替え

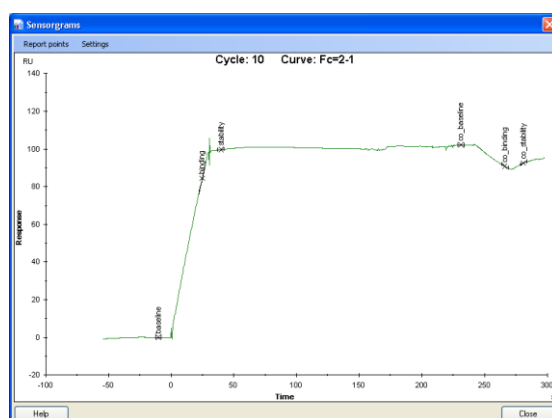
右側のテーブルの Y-Value をクリックします。カラムタイトルが、Y-Value に変更され、結合レスポンスが低い順に並べ替えられます。

引き続き、Y-Value をクリックすると、カラムタイトルは Y-Value に変更され、高い順に並びます。

ポイントの色の変更

ポイントの色を変更したい場合には、右 Table 上部の Tools をクリックします。

Color By で変更方法を選択します。

センサーグラムの表示

ポイント上にマウスのポインターを移動して、マウスを右クリックして **Show Sensorgram** をクリックします。Y 軸=0 に補正したセンサーグラムとレポートポイントが表示されます。複数のセンサーグラムを表示したい場合には、Table で該当のサンプルを選択後、マウス右クリック、**Show Sensorgrame (S)**をクリックします。

ポイントの削除

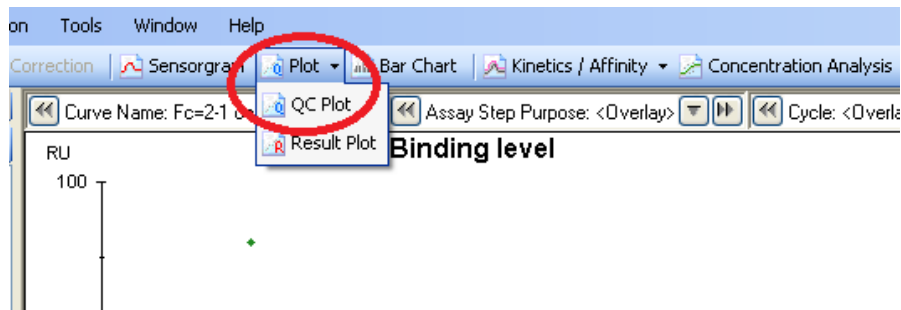
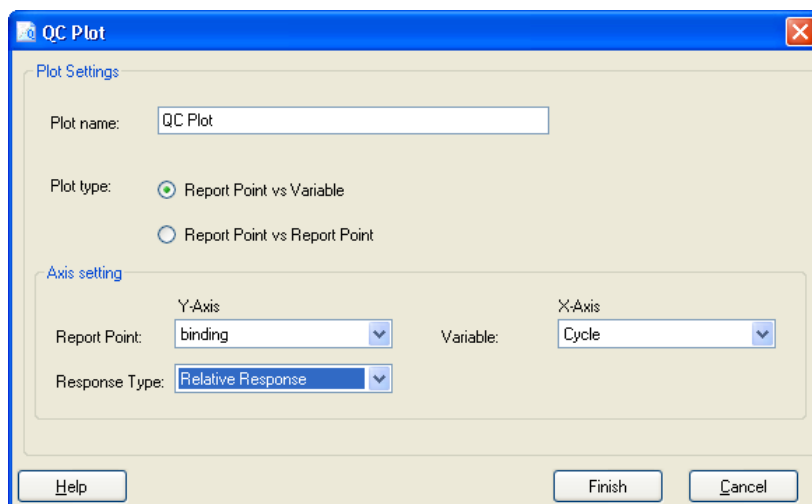
除きたいポイントがある場合には、ポイント上にマウスポインターを移動後、マウスの右クリック、**Exclude Cycle** をクリックします。ポイントがプロットから消え、画面右の Table の該当サンプルが赤字に変わります。再度プロットに入れる場合には、Table の該当サンプルを選択後、マウス右クリック、**Include Cycle(s)**を選択します。

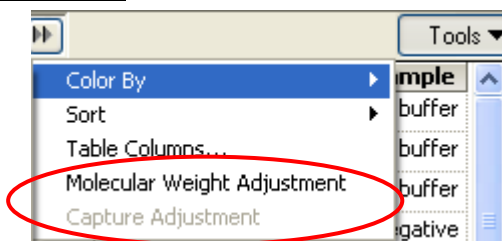
自動作成された Plot および QC Plot で Exclude したサンプルは、Result Plot には持ち込まれません。

なお、別途 Plot を作成したい場合や、分子量補正やキャプチャー量補正を行った Plot を作成したい場合には、新たに QC Plot を作成します。（分子量補正、キャプチャー量補正は、

Result Plot でも行えます。）

新たに QC Plot を作成する際には、**Plot→QC Plot** を選択します。

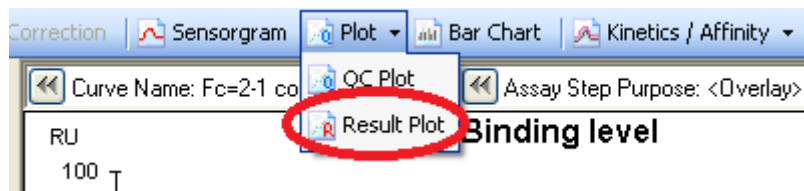
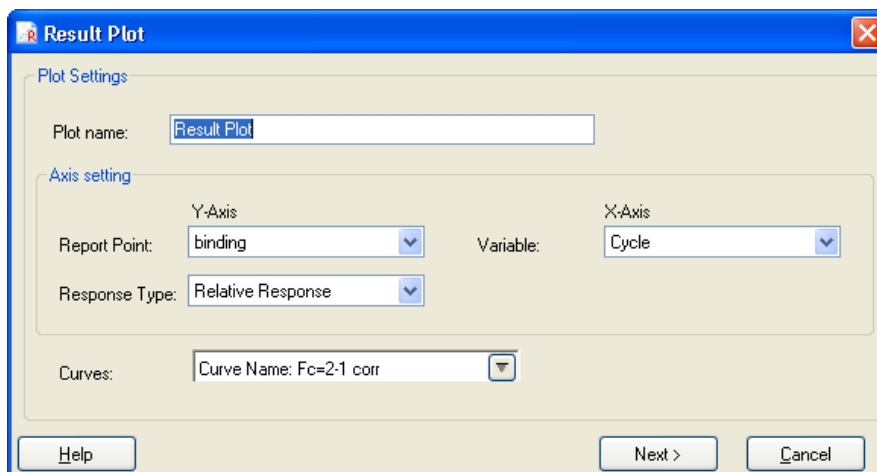
↓

Plot name にプロット名を入力して、**Y-Axis**、**X-Axis** をプルダウンメニューから選択します。

Finish をクリックします。画面左の Plot フォルダ内に QC Plot が追加されます。

分子量補正、キャプチャー量補正

Binding level のプロットで分子量補正を行いたい場合には、 Tools の **Molecular Weight Adjustment** を選択してください。（あらかじめ、**Keyword Table** に分子量が入力されている必要があります。）プロットの Y 軸の単位は、100 × RU / Da に変わります。

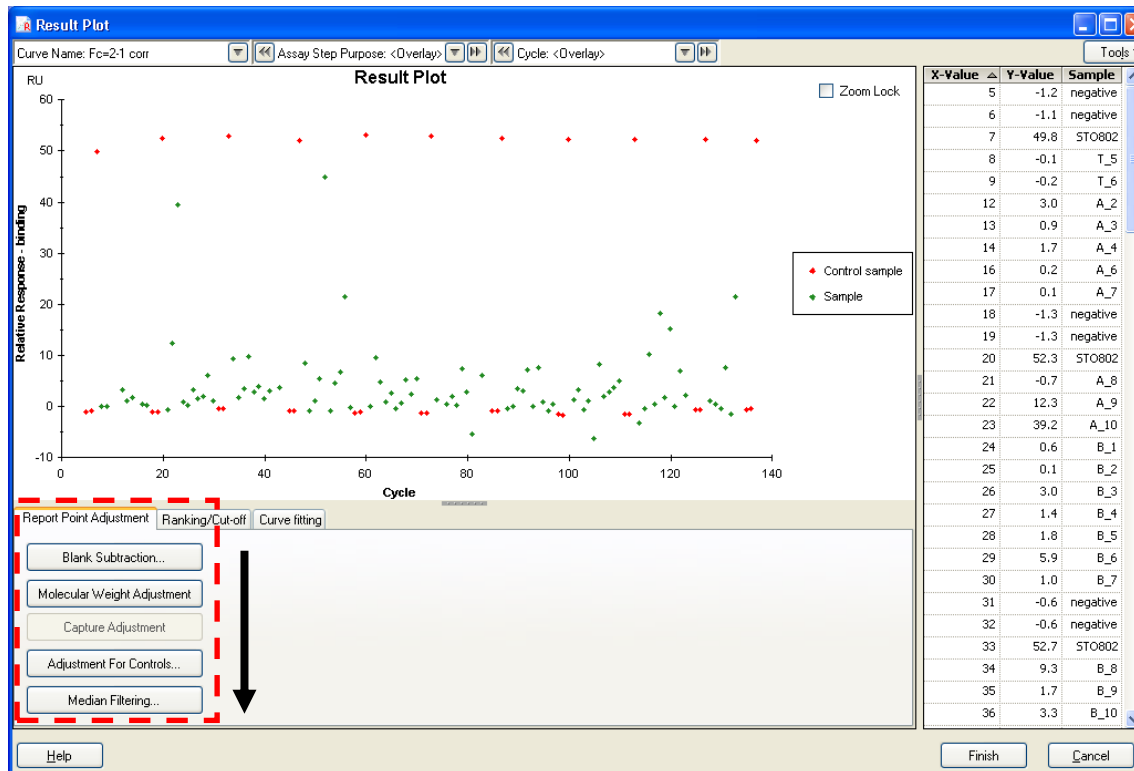
キャプチャー法を使用している場合には、 Tools の **Capture Adjustment** を使用すると、キャプチャー量で分子量を補正したプロットが作成されます。
（いずれの補正もプロットのポイントに適用されますが、センサーグラムには適用されません。）

↓

次に、解析用の Result Plot を作成します。Plot の **Result Plot** をクリックします。

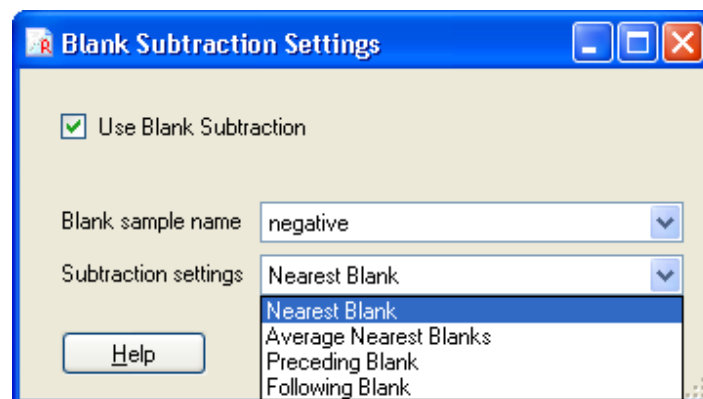
↓

作成したいプロットの指定を行います。

Plot name にプロット名を入力します。**Y-Axis**、**X-Axis** と **Curves** の選択を行います。
Next をクリックします。

↓

Result Plot ウインドウが開きます。

Report Point Adjustment タブで各種データ補正を選択します。上から順番に補正を実行すると、前の補正が適用された上で次の補正を適用することができます。

Blank Subtraction

ブランクの差し引きを行います。ネガティブコントロール、または、サンプルのゼロ濃度がブランクとして認識されます。

Blank Subtraction をクリックします。**Use Blank Subtraction** にチェックを入れます。**Blank sample name** をプルダウンメニューから選択します。ネガティブコントロール、または、サンプルのゼロ濃度（Sample Conc=0）から選択します。

差し引き方法を **Subtraction settings** のプルダウンメニューから選択します。

Nearest Blank:	最も近いブランク
Average Nearest Blanks:	サンプル測定前後の最も近いブランク 2 点の平均値 サンプル測定前または後にブランクがない場合には、最も近いブランクを使用します。
Preceding Blank:	サンプル測定前の最も近いブランク サンプル測定前にブランクがない場合には、最も近いブランクを使用します。
Following Blank:	サンプル測定後の最も近いブランク サンプル測定後にブランクがない場合には、最も近いブランクを使用します。

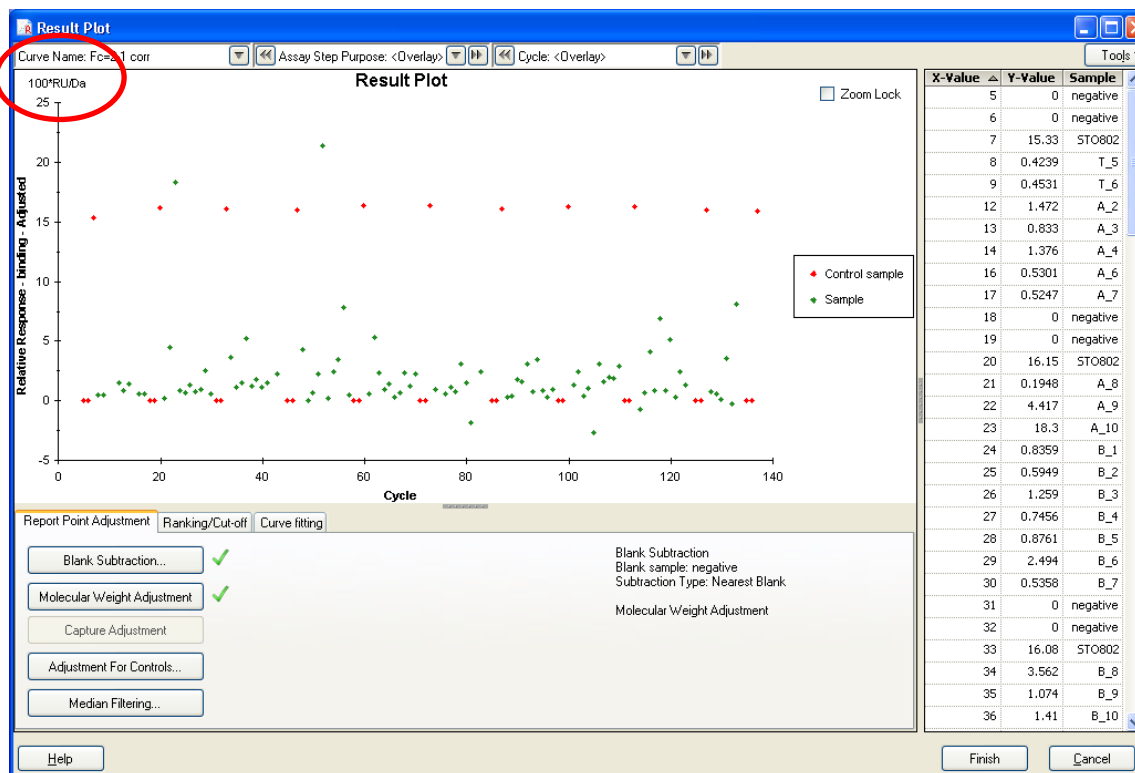
<u>Molecular Weight Adjustment</u>

分子量補正を行います。化合物スクリーニングで有効です。補正式は次の通りです。

100 × レスポンス（RU）/ 分子量（Da）

Keyword Table で分子量が入力されていないものや、ゼロと入力されている場合には、プロットから除外されます。

補正後は、プロットの Y 軸の単位が、100 × RU / Da に変わります。

X-Value	Y-Value	Sample
5	0	negative
6	0	negative
7	15.33	STO802
8	0.4239	T_5
9	0.4531	T_6
12	1.472	A_2
13	0.833	A_3
14	1.376	A_4
16	0.5301	A_6
17	0.5247	A_7
18	0	negative
19	0	negative
20	16.15	STO802
21	0.1948	A_8
22	4.417	A_9
23	18.3	A_10
24	0.8359	B_1
25	0.5949	B_2
26	1.259	B_3
27	0.7456	B_4
28	0.8761	B_5
29	2.494	B_6
30	0.5358	B_7
31	0	negative
32	0	negative
33	16.08	STO802
34	3.562	B_8
35	1.074	B_9
36	1.41	B_10

Capture Adjustment

リガンドのキャプチャーを行ったデータで使用できます。次の式を使用します。

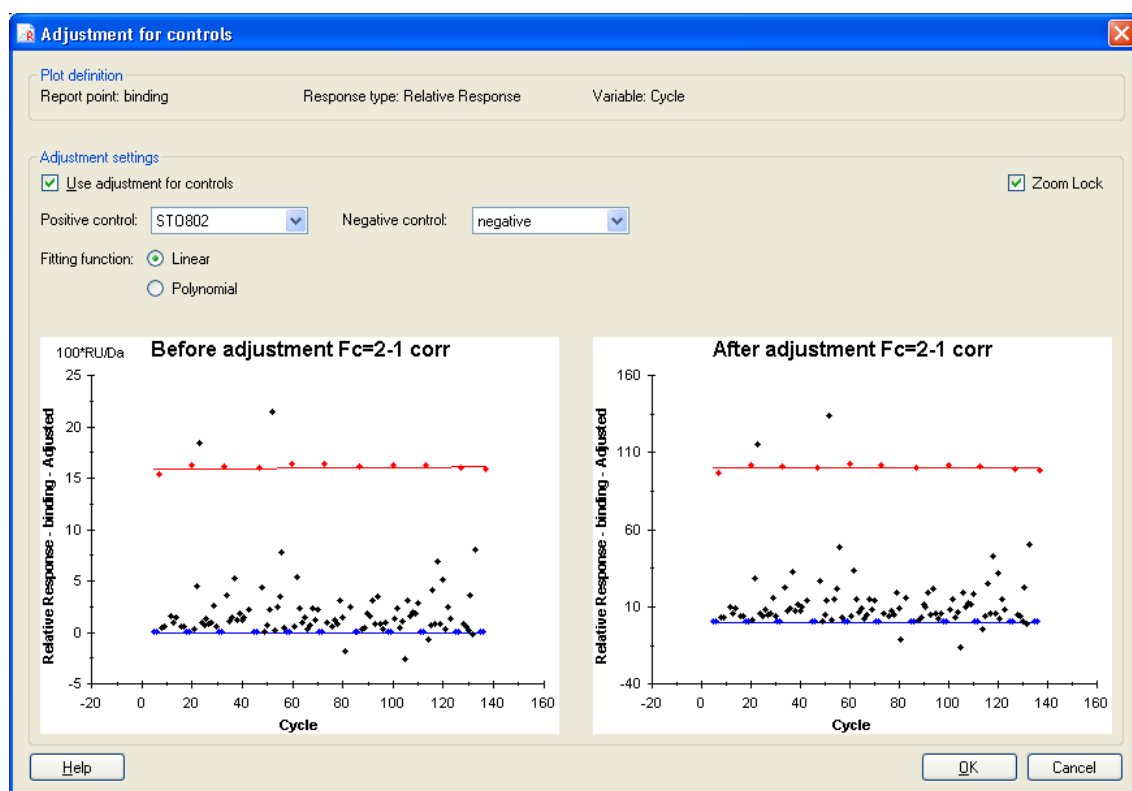
レスポンス（RU）/ リガンドのキャプチャー量（RU）

キャプチャー量は、レポートポイントのbaselineからCapture_baselineを差し引いた値です。

Adjustment For Controls

コントロールの結合量を利用した補正方法です。再生条件が強くリガンドの結合活性がアッセイ中に低下している場合や、リガンドが時間経過とともに失活している場合に使用します。リガンドの結合活性低下を、定期的に測定したコントロールサンプルの結合量を利用して補正を行います。

Adjustment For Controls をクリックします。

Use adjustment for controls にチェックを入れます。

Positive control および **Negative control** をプルダウンメニューから選択します。

ネガティブコントロールを取っていない場合には、[None]を選択するとネガティブコントロールとしてゼロを使用します。（Set zero level で値を変更することもできます。）

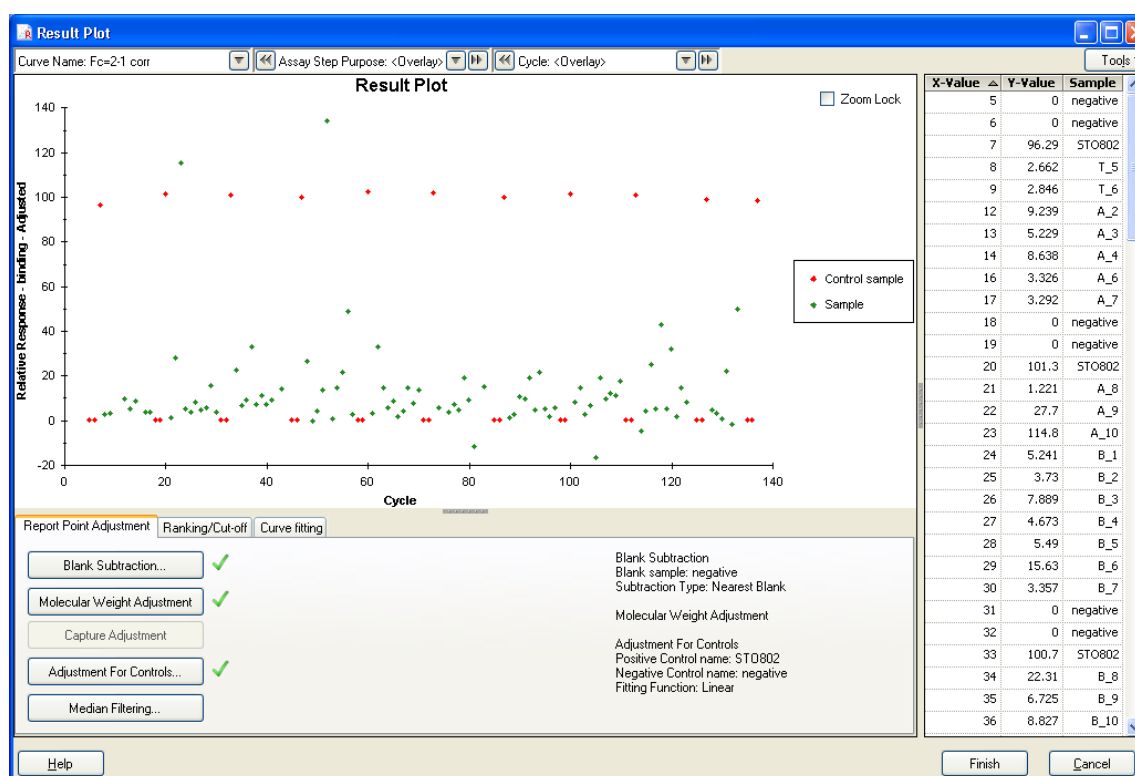
スタートアップサイクルは自動的にプロットから排除されます。

Fitting function で、Fitting 方法を選択します。

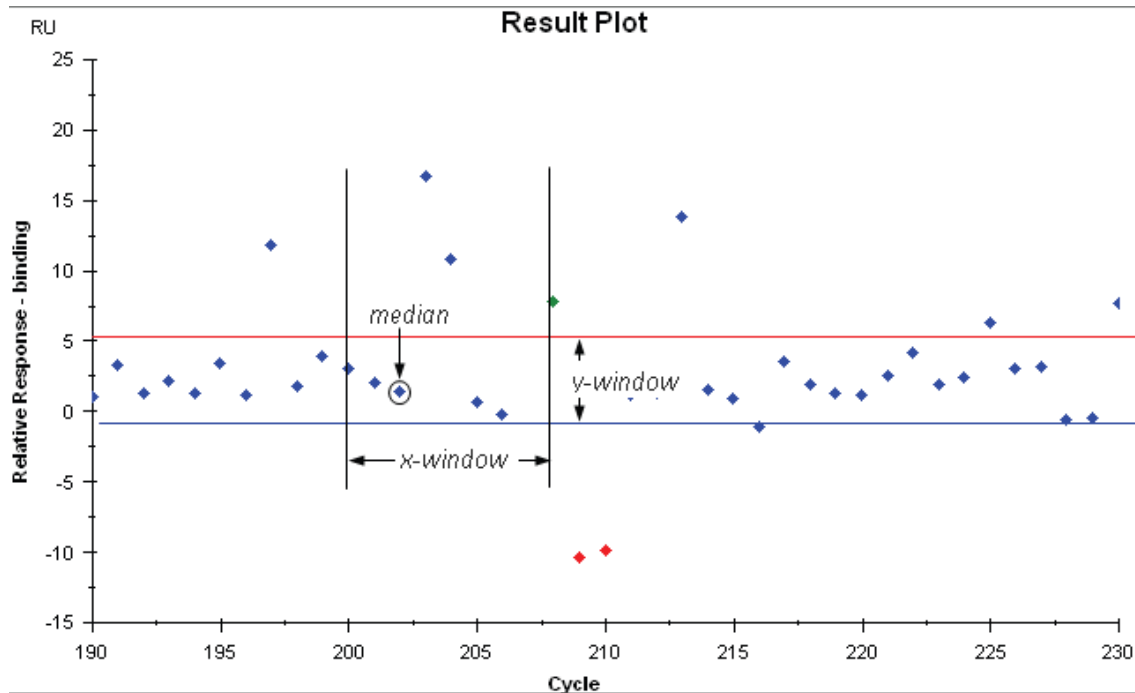
Linear:　Y = aX + b（a および b は定数）を使用します。

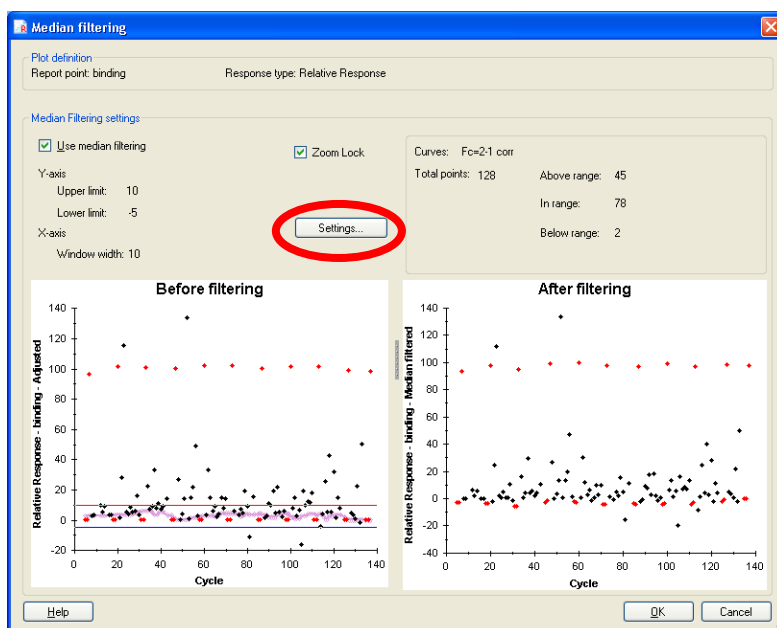
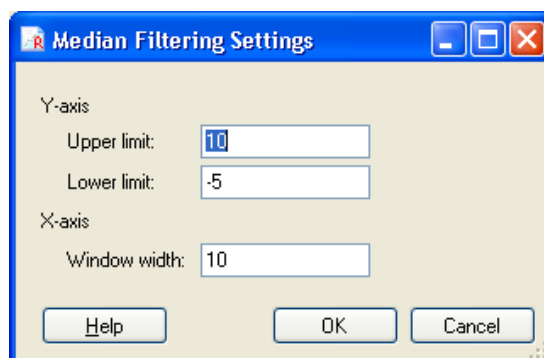
Polynomial:　Y = aX² + bX + c（a、b および c は定数）を使用します。
コントロールサンプルのポイントが 4 つ以上必要です。

Fitting 結果が、右のプロットに表示されます。赤色ライン：ポジティブコントロール、青色ライン：ネガティブコントロールで、赤色ラインが Y = 100、青色ラインが Y = 0 になるように計算を行います。同時に各ポイントが補正されます。

OK をクリックします。

Median Filtering

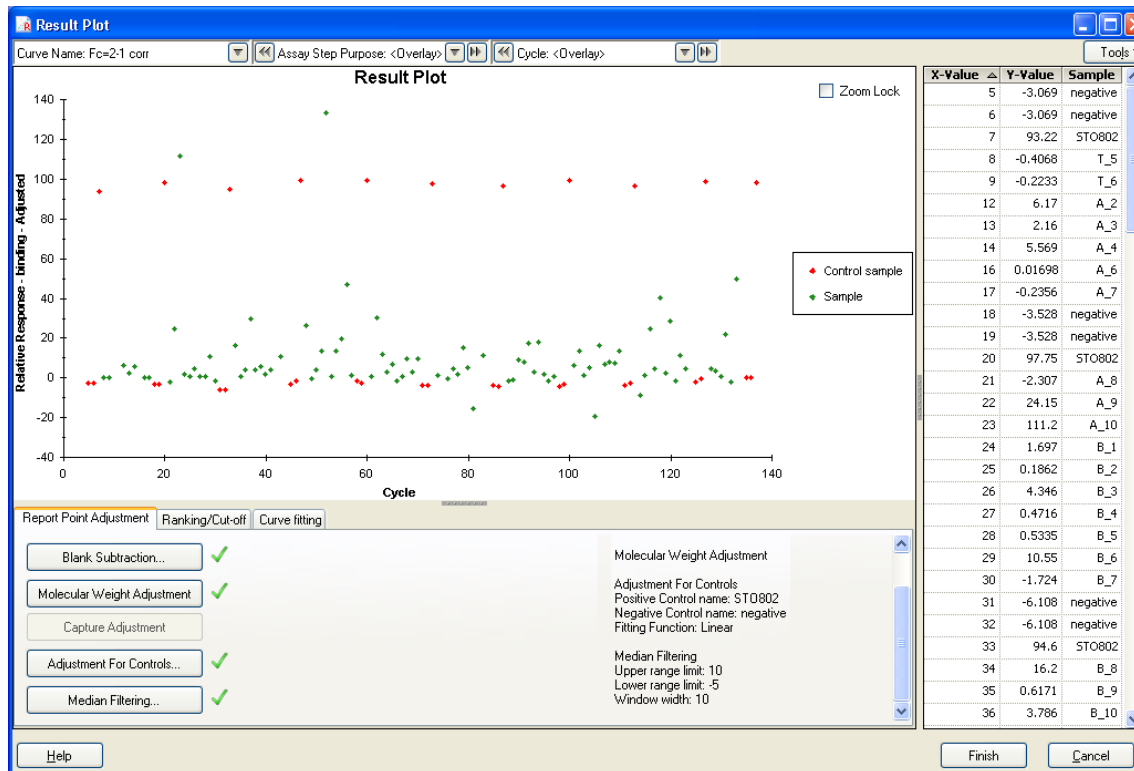
メジアンフィルターを適用することで、結合レスポンスに影響を与えることなく、ノイズを低減して、プロットのドリフトを排除することができます。プロットがドリフトしている場合や、周期的にベースラインが変動している場合に有効です。

水平な Y 軸ウインドウと、スライドする X 軸ウインドウ（サイクル）の中央値でデータポイントの補正を設定します。Y 軸ウインドウの設定では、推定される non-binder が含まれ、potential binder を除いた範囲に設定します。中央値は、各 X 軸ウインドウ内で、Y 軸ウインドウ内の中間に位置するポイントの Y 軸の値を取ります。

各 X 軸ウインドウの中央値を Y＝0 として、ベースラインを作成します。プロットの各ポイントから、各サイクルについて算出された中央値を差し引いて補正を行います。ファイルを複数呼び込んでいる場合には、各ファイルのデータを 1 グループとしてグループごとに補正を行います。

Median Filtering をクリックします。**Use median filtering** にチェックを入れます。Y-axis、X-axis の設定がデフォルト表示されます。変更する際には、**Settings** をクリックします。

Y軸ウインドウのUpper limitとLower limitに値(RU)を入力します。X軸ウインドウのWindow width（サイクル数）を設定します。5 以上に設定します。**OK** をクリックします。

（Y 軸ウインドウは、左のプロットの赤または青ラインをマウスポインターでドラッグして設定することもできます。）

左プロットの紫色のラインは各サイクルについて算出された中央値です。Y 軸の Upper limit は赤ライン、Lower line は青ラインです。右プロットでは、中央値が Y = 0 に設定され、各ポイントから中央値が引かれた値がプロットされています。

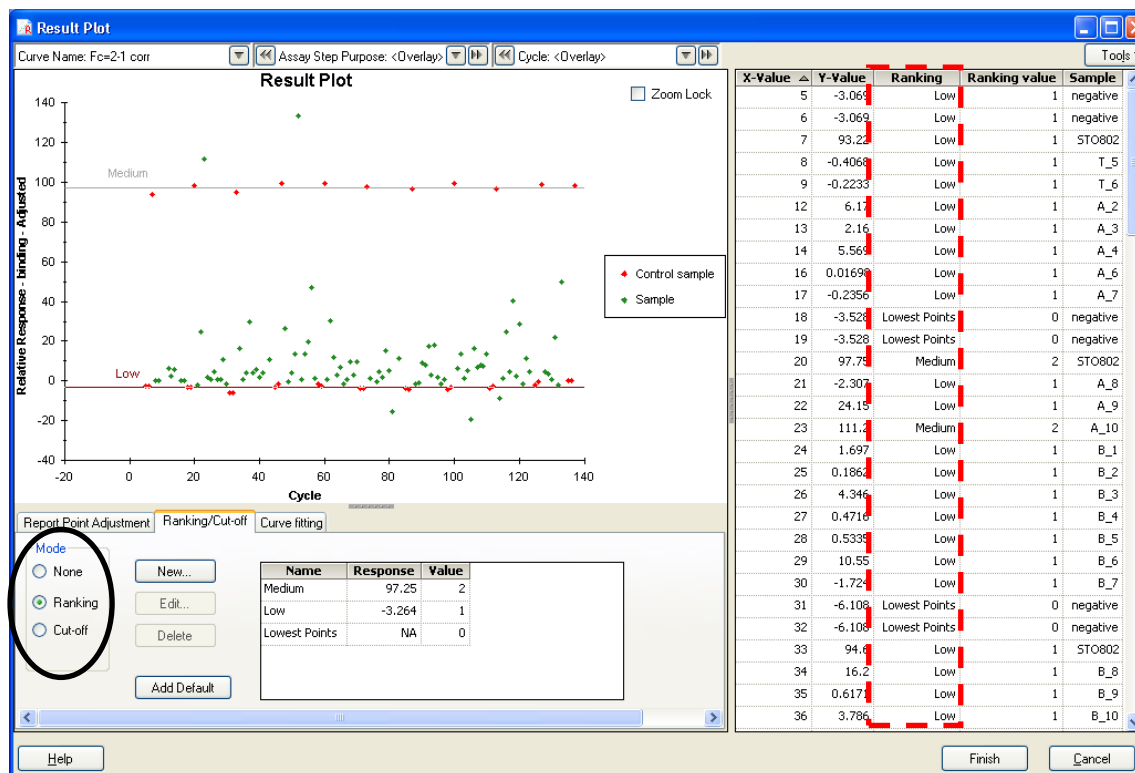
OK をクリックします。

設定した補正が全て適用されたプロットが表示されます。

↓

Ranking/Cut-off タブをクリックします。

Ranking または Cut-off の設定ができます。（Ranking と Cut-off は同時に設定できません。）

Ranking

Mode→Ranking を選択します。

コントロールサンプルを測定している場合には、ランキングの値としてコントロールサンプルの平均値が自動設定されます。

上のプロットでは、ネガティブコントロールとポジティブコントロールの平均値で、それぞれ Low、Medium のラインが引かれています。

Table の Ranking に、ランキング結果が表示されます。Low 以下のポイントは Lowest Points、Medium 以下のポイントは Low、Medium より大きいポイントは Medium とランキングされます。Value には、ランキング用の数値が入力されています。

ランキングのレスポンス、Name および Value を変更したい場合には、プロット上のラインをマウスポインターでドラックして変更するか、下の一覧の該当する Name を選択後、**Edit** をクリックして変更を行います。ランキング項目を増やしたい場合には、**New** をクリックして追加します。

Cut-off

Mode→Cut-off を選択します。

デフォルトでは選択したサンプル（通常、ネガティブコントロール）の 3SD に Cut-off 値が設定されています。画面下の **Edit Settings** で Cut-off 値の設定が可能です。数値で設定したい場合には、画面下の **Manual** を選択後、**Edit Settings** でレスポンスを設定します。

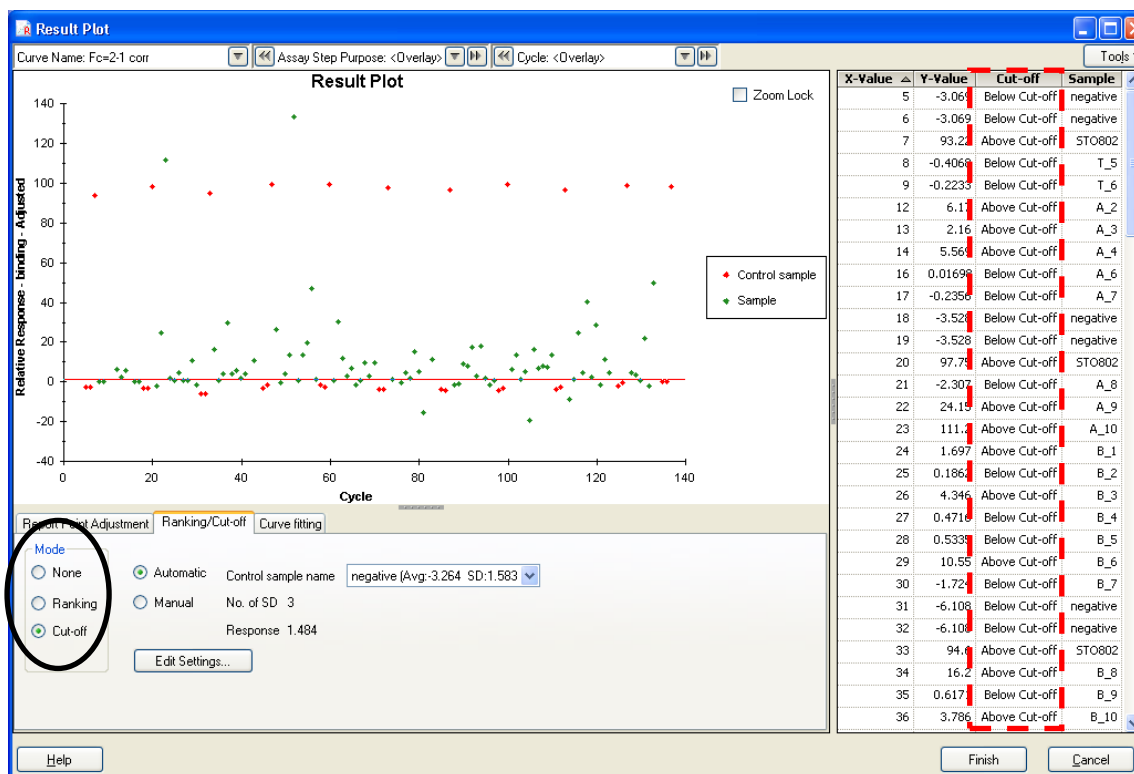



Table の Cut-off に結果が表示されます。Cut-off 以下の値は Below Cut-off、Cut-off 値より大きい値では Above Cut-off と表示されます。

↓

画面右下の **Finish** をクリックして、Result Plot の解析を終了します。

画面左の Plot フォルダ内に、Result Plot が追加されます。再解析を行いたい場合には、Result Plot を選択後、マウス右クリック、**Edit** を選択します。**File→Save as** で結果を保存します。

解析結果は、**File→Export→Result To Excel** で、テキスト形式で保存できます。

プロットは、プロット上でマウス右クリック、**Copy Graph** を選択後、Paint または WordPad に貼り付けて保存します。

解析メソッドの保存・実行

同じ内容で繰り返し測定・解析を行う場合には、設定した解析方法をメソッドとして保存して、次回の解析で使用することができます。メソッドを保存する場合には、**File→Save Evaluation Method As** を選択して保存先と保存内容を指定します。メソッド使用時には、解

析データを **File→Open** で呼び出し後、**File→Apply Evaluation Method** を選択してメソッドを呼び出し適用します。

補足 1-8. 注釈・コメントの追加

選択したポイントに対して注釈、コメントを Table に追加できます。

例えば、プロット確認時に、溶液効果が大きいポイントや R_{max} を超えているポイントに注釈・コメントを入れることができます。

画面右の **Tools→Edit Annotations** をクリックします。

Add Annotation を選択して、注釈を入力します。また、Annotation を選択した状態で、**Add Comment** を選択して、コメントを追加します。コメントは複数追加できます。

別途、Annotation を追加する場合には、上記操作を繰り返します。

作成した Annotation を保存して、別データの解析時に使用する場合には、下の **Save Annotation As Template** にチェックを入れます。保存しない場合には、作成した Annotation は実行中のファイル内のみで適用されます。また、最終保存したものがテンプレートとなります。

OK をクリックします。

↓

Annotation を入れる場合には、プロットのポイントを選択して、Table の該当サンプル上でマウス右クリック、**Annotations** を選択して、Annotation から Comment を選択します。Table に情報が追加されます。

補足 1-9. Curve Fitting

Result Plot の Curve fitting タブでは、プロットを Linear または 4-parameter で Fitting することができます。

レポートポイントテーブルの確認

画面右の **Report Point Table** を選択します。

↓

Evaluation Explorer に Report Point Table フォルダとファイルが追加され、Work area には、全測定サイクル分のデータが表示されます。

Cycle	Fc	Report Point	Time [s]	Window [s]	AbsResp [RU]	SD	Slope [RU/s]	LRSD	RelResp [RU]	Baseline
	4-3	binding								
7	4-3	binding	244.8	5	8363.5	0.1549	-0.02497	0.1519	-4.8	No
8	4-3	binding	244.8	5	8321.6	0.2039	-0.08206	0.1651	-2.0	No
9	4-3	binding	244.8	5	8281.4	0.2093	-0.1026	0.1449	-0.9	No
10	4-3	binding	244.8	5	8242.4	0.149	-0.04047	0.1377	0.4	No
11	4-3	binding	244.8	5	8206.9	0.1839	-0.04043	0.1756	3.6	No
12	4-3	binding	244.8	5	8174.0	0.2319	-0.0974	0.183	7.4	No
13	4-3	binding	244.7	5	8145.2	0.1998	-0.06585	0.176	14.5	No
14	4-3	binding	244.8	5	8118.2	0.1545	-0.009818	0.1553	22.1	No
15	4-3	binding	244.8	5	8093.7	0.191	-0.02562	0.1891	31.0	No
16	4-3	binding	244.7	5	8031.0	0.129	-0.006455	0.1299	0.0	No
17	4-3	binding	244.7	5	7999.7	0.1641	-0.05382	0.1447	-0.9	No
20	4-3	binding	244.8	5	7916.2	0.1879	-0.03872	0.1807	-1.1	No
21	4-3	binding	244.8	5	7939.0	0.1998	0.0676	0.1745	49.9	No
22	4-3	binding	244.7	5	7943.9	0.2045	0.1028	0.1373	78.9	No
23	4-3	binding	244.8	5	7950.3	0.1786	0.06665	0.1501	111.1	No
24	4-3	binding	244.8	5	7950.2	0.1799	0.03736	0.1729	135.2	No
25	4-3	binding	244.7	5	7940.0	0.1777	-0.03608	0.1712	149.4	No
26	4-3	binding	244.7	5	7924.5	0.1537	-0.0303	0.1484	157.8	No
27	4-3	binding	244.7	5	7905.8	0.1702	-0.008681	0.1714	162.4	No
28	4-3	binding	244.8	5	7885.2	0.1648	0.0315	0.1596	164.1	No
29	4-3	binding	244.8	5	7743.3	0.278	0.1533	0.1607	45.1	No
30	4-3	binding	244.8	5	7671.5	0.1333	-0.02218	0.1304	-0.4	No
33	4-3	binding	244.8	5	7611.4	0.1967	0.01423	0.1976	1.4	No
34	4-3	binding	244.7	5	7591.1	0.1807	-0.006287	0.1823	2.4	No
35	4-3	binding	244.8	5	7571.6	0.1656	-0.01462	0.1658	3.3	No
36	4-3	binding	244.8	5	7552.8	0.1918	-0.01823	0.1918	3.0	No
37	4-3	binding	244.6	5	7534.6	0.1905	-0.01102	0.1918	3.6	No
38	4-3	binding	244.8	5	7515.2	0.1539	-0.01717	0.1533	3.5	No
39	4-3	binding	244.8	5	7496.9	0.1686	0.01661	0.1685	3.7	No
40	4-3	binding	244.8	5	7479.9	0.1488	-0.03216	0.1423	4.2	No
41	4-3	binding	244.7	5	7463.7	0.1749	-0.002334	0.1766	4.4	No
42	4-3	binding	244.7	5	7446.5	0.2192	-0.1079	0.1509	3.6	No
43	4-3	binding	244.9	5	7428.7	0.1858	0.009381	0.1871	2.6	No

各カラム上部のフィルターを使用し、必要データを抽出できます。

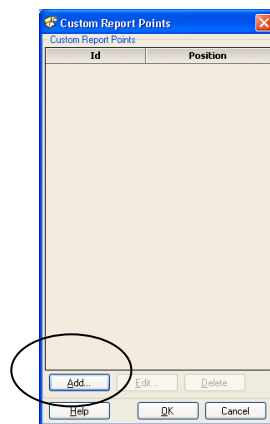
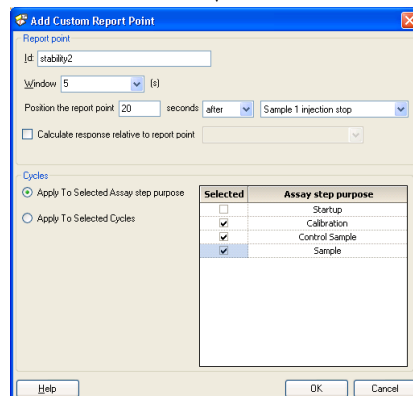
Fc	リファレンス差し引きデータ
Report Point	binding（結合レスポンスのレポートポイント名）
Assay Step	Sample（緩衝液添加サイクルなどを除きます）

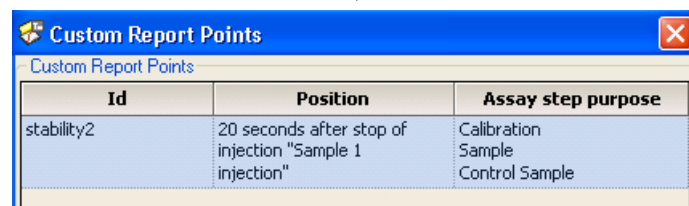
RelResp [RU] を 2 回クリックすると、結合レスポンスが高い順に並びます。

補足 1-10. レポートポイントの追加

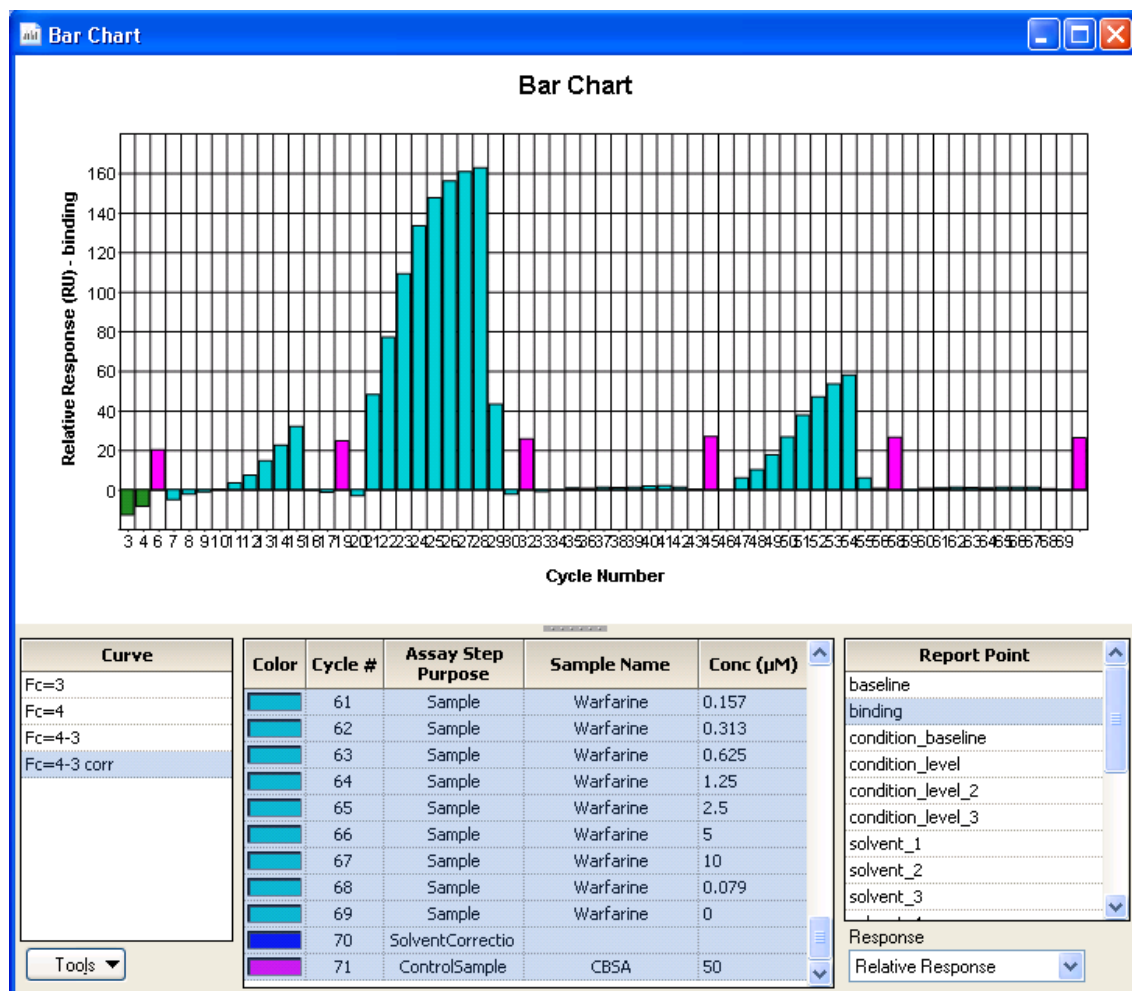
Tools → Custom Report Points...をクリックします。

Add...をクリックします。

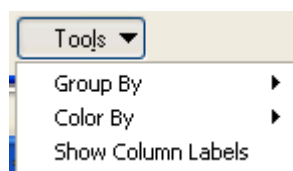
↓

Id にレポートポイントの名前を入力します。追加する位置を設定し、Cycles でどのサイクルで記録するか設定します。OK をクリックします。

↓

初期画面に、追加したレポートポイントが表示されます。

補足 1-11. 結合量のグラフ化

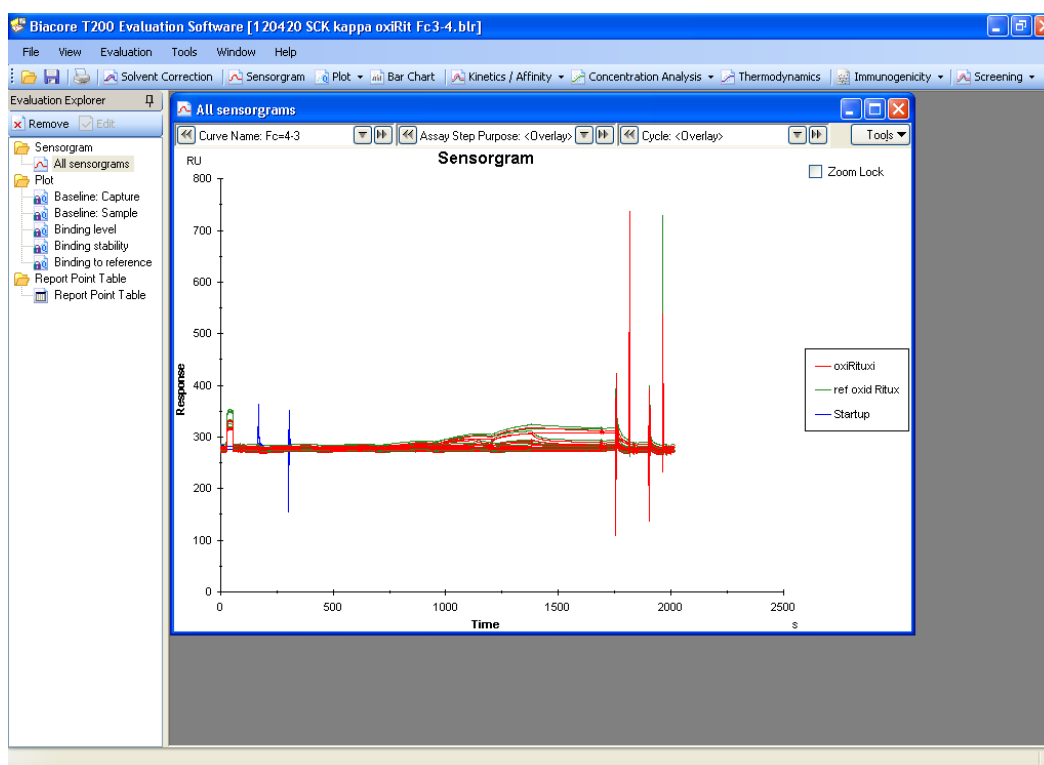
結合量を棒グラフとして表示する場合には、Toolbar の Bar Chart をクリックします。

結合量が棒グラフとして表示されます。

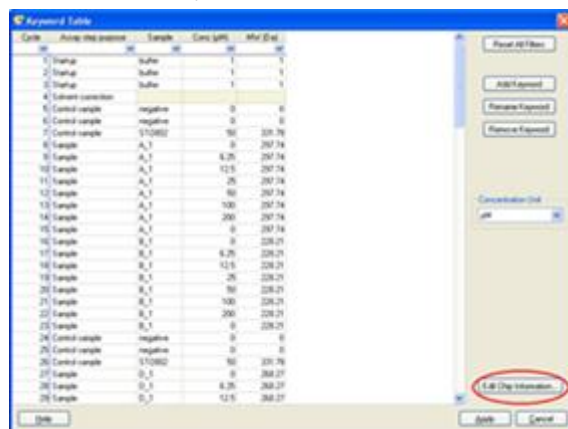
Curve でグラフ化するセンサーグラムを選択します。複数選択も可能です。

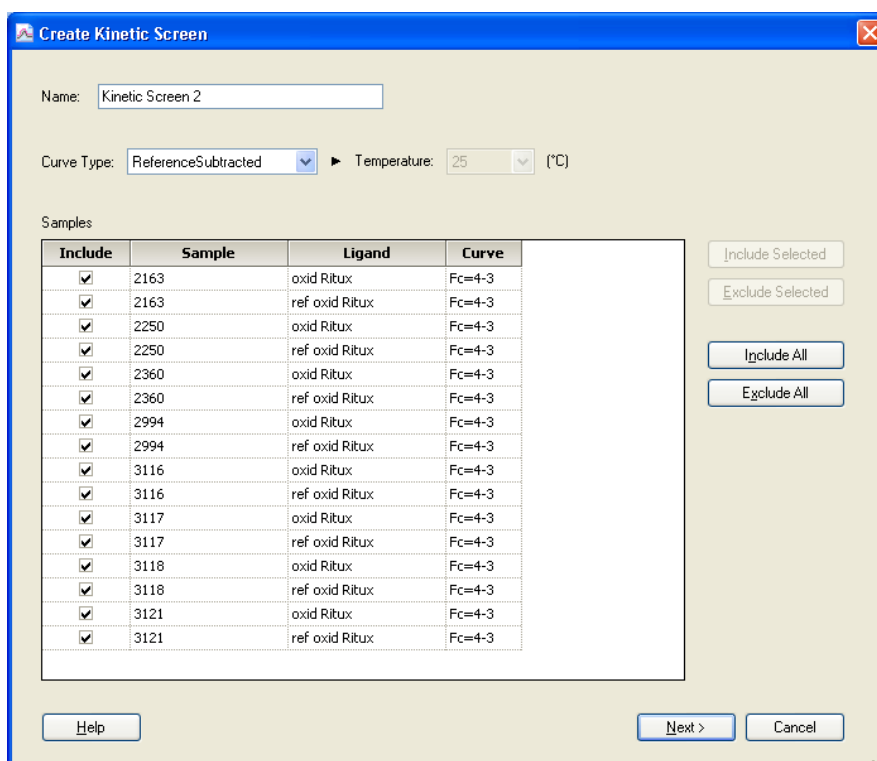
表示方法、色、カラムラベルの表示を変更する場合には、Tools をクリックして変更したい項目を選択します。

2. Kinetics/Affinity スクリーニング

解析ソフトウェアの、Kinetics/Affinity scree を使用することで、多サンプルの Kinetics/Affinity 解析を一括して行うことができます。複数のデータファイルを持ち込んで一括解析を行うことも可能です。最大 200 濃度シリーズ（5 濃度, data correction rate: 10Hz）の解析が可能です。マルチサイクル法、シングルサイクル法で可能です。
測定プログラムは、サンプル数が少ない場合と同様で、wizard の Kinetics/Affinity または、メソッドを使用します。(日本語取扱説明書　基本操作編 5. 相互作用測定を参照ください。)
ここでは、Kinetics スクリーニング、Affinity スクリーニングについて、解析ソフトウェアの使用方法を紹介します。

2-1. Kinetics スクリーニングのデータ解析

溶媒補正が必要な場合には、溶媒補正後に解析に進みます。（Biacore T200 日本語取扱説明書 応用編 3 章を参照。）また、解析前に、Plot を使用したデータの QC を行ってください。（(Biacore T200 日本語取扱説明書 応用編 1-2 章を参照。)

補足 2-1. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。
リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。

Tool bar の Screening をクリックし、 Kinetic Screen をクリックします。

↓

Name	解析結果の名前（必要に応じて変更します）
Curve Type	ReferenceSubtraction を選択します
Temperature	温度を変えて測定している場合には、解析する温度を選択します

画面下の Table の **Include** で、解析に持ち込むサンプルにチェックを入れます。

画面左に、ゼロ濃度を差し引いたセンサーグラムの一覧が表示されます。表示は、**View** の、**Small Thumbnails**、**Standard Thumbnails**、**Extended Thumbnails** で変更できます。並びは、Arrange By で変更できます。選択したセンサーグラムの詳細情報は、画面右で確認できます。

ブランクサブトラクション、サンプルサイクルの選択

センサーグラム下の **Display Blanks** を選択すると、そのサンプル名のゼロ濃度センサーグラム（ブランク）が表示されます。画面下の **Included Curves** の を選択するとゼロ濃度サイクルとサンプルサイクルの一覧を確認できます。ここで、ゼロ濃度および解析に持ち込むサンプルの選択が可能です。Include のチェックを外すと、解析から除くことができます。ゼロ濃度サイクルが複数ある場合には、選択したゼロ濃度センサーグラムの平均が差し引かれます。なお、ゼロ濃度の測定を行っていない場合には、Table 下の **Blanks from other sample series** から選択することができます。

ステータスの設定

各センサーグラムのステータスを設定できます。
ここでは、次の 3 つのステータスを設定できます。

　Rejected　解析に持ち込まないセンサーグラム
（結合していない、乱れが大きいなど）

　Cleared　デフォルト設定、解析に持ち込むセンサーグラム

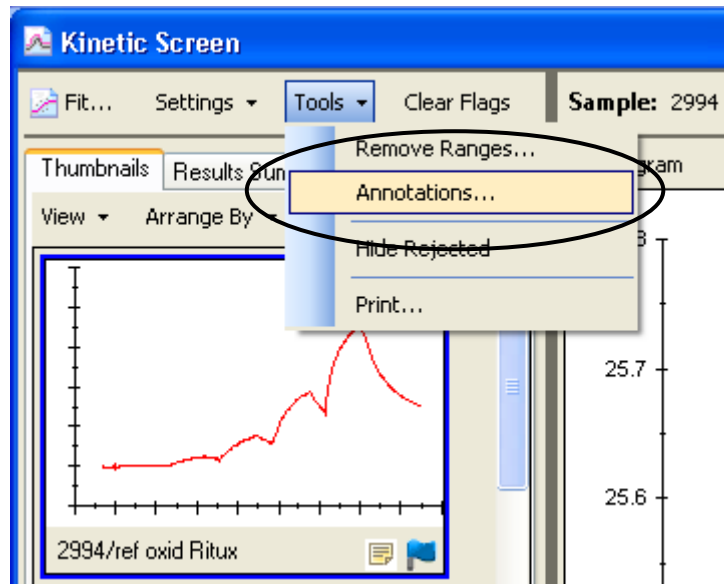
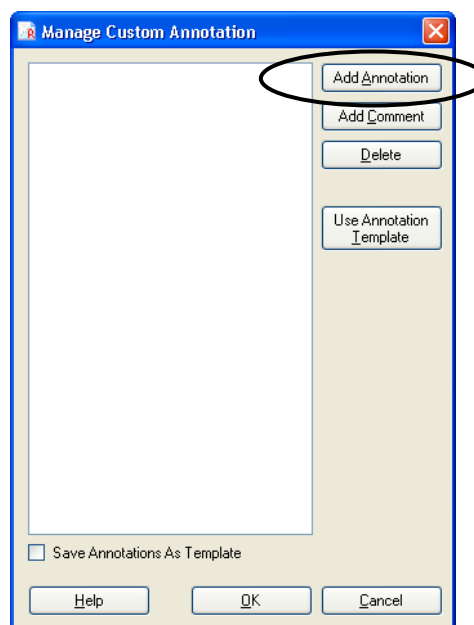
　Flagged　解析に持ち込むが、Flag を立てるセンサーグラム

ステータスを設定する場合には、画面左の各センサーグラムの をクリックして、ステータスを変更します。または、センサーグラム上で右クリックして、ステータスを選択します。

左上の **Tools→Hide Rejected** で、Reject したセンサーグラムを非表示にできます。
Clear Flags で、Flag を解除できます。
注釈・コメントを設定したい場合には、補足 2-2 を参照ください。

補足 2-2. 注釈・コメントの追加

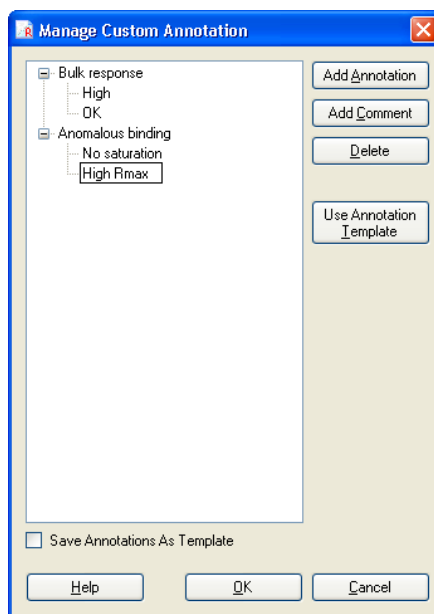
選択したセンサーグラムに注釈・コメントを追加できます。

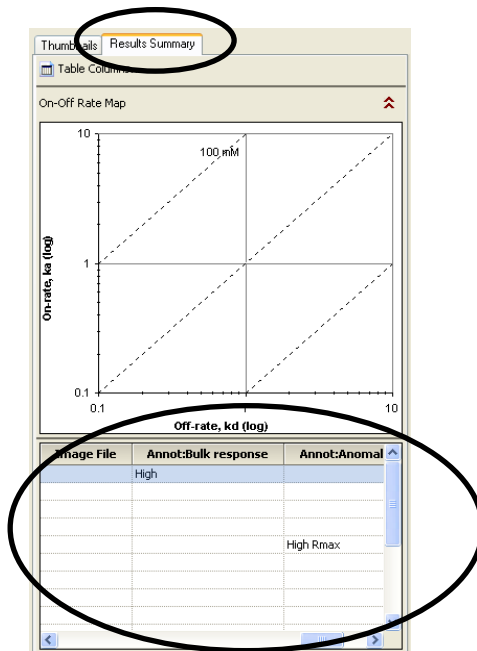
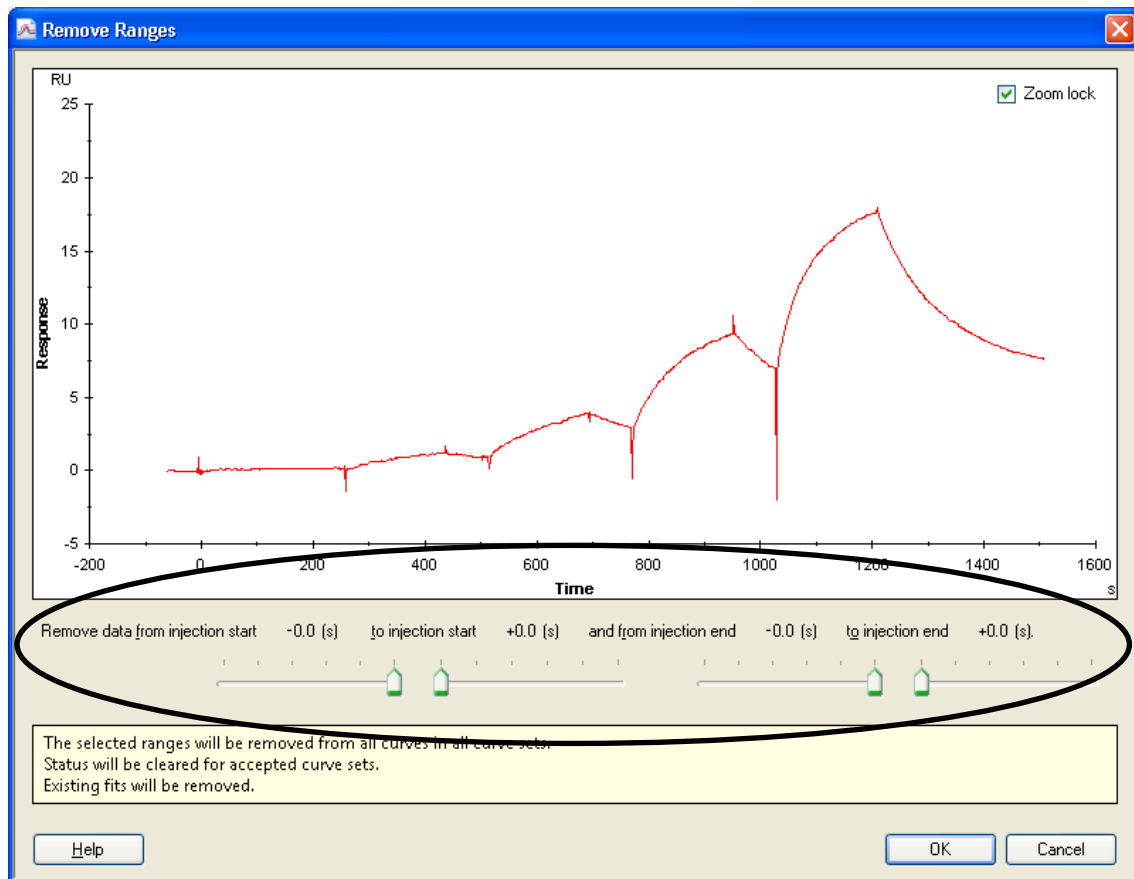
例えば、センサーグラム確認時に、溶液効果が大きいポイントや R_{max} を超えているポイントに注釈・コメントを入れることができます。

画面左の **Tools →Annotations** をクリックします。

Add Annotation を選択して、注釈を入力します。また、Annotation を選択した状態で、**Add Comment** を選択して、コメントを追加します。コメントは複数追加できます。

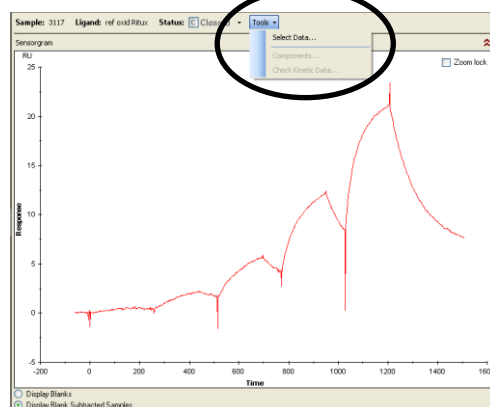
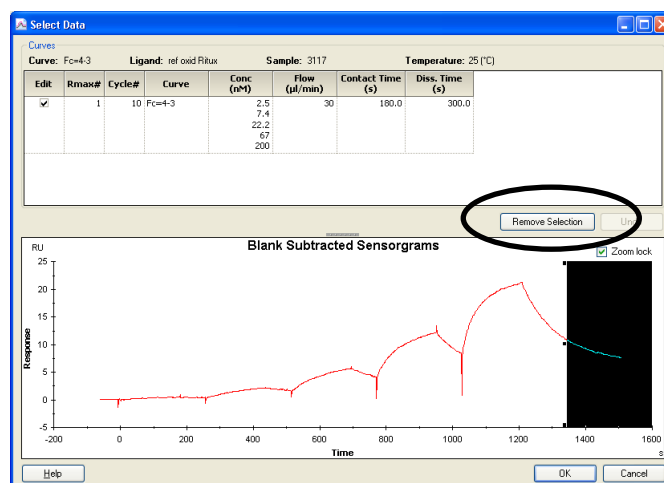
別途、Annotation を追加する場合には、上記操作を繰り返します。

作成した Annotation を保存して、別データの解析時に使用する場合には、下の **Save Annotation As Template** にチェックを入れます。保存しない場合には、作成した Annotation は実行中のファイル内のみで適用されます。また、最終保存したものがテンプレートとなります。

OK をクリックします。

↓

Annotation を入れる場合には、プロットのポイントを選択して、Table の該当サンプル上でマウス右クリック、**Annotations** を選択して、選択したい Annotation から Comment を選択します。**Results Summary** タブの Table の Annotation で、設定したコメントを確認できます。

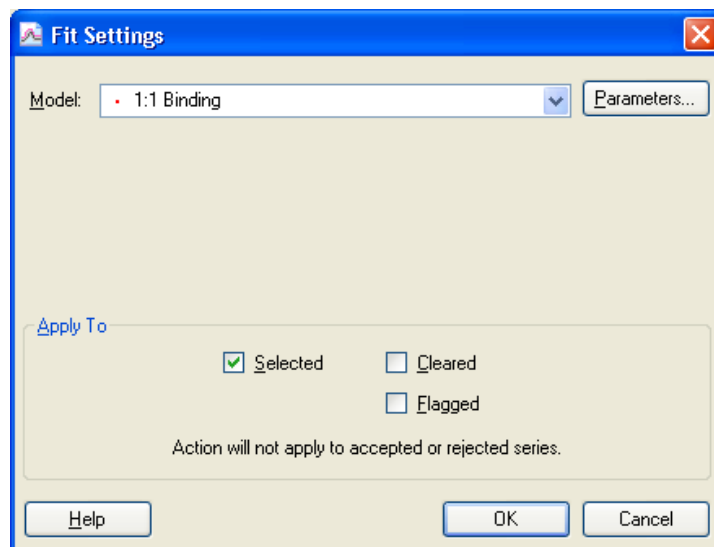
↓

添加開始・終了時のノイズを除きたい場合には、画面左上の Tools の **Remove Ranges** をクリックします。

画面下のスライダーを動かして、解析から除く範囲を設定します。
OK をクリックすると、全てのセンサーグラムに設定した範囲が適用されます。

それぞれのセンサーグラムで、センサーグラムの領域削除を行いたい場合には、**Thumbnails** タブでセンサーグラムを選択後、右上の **Tools→Select Data** をクリックします。

センサーグラム上で、マウスの右クリック、ドラッグで範囲を設定し **Remove Selection** を選択します。選択した領域が削除されます。**OK** をクリックします。

↓

解析モデルの設定を行います。

画面左上の **Settings** の **Fit Settings** をクリックします。

↓

Model	解析モデルを選択します
Parameters	選択したモデルの初期値、Fitting 方法などの変更ができます

Apply To で、選択したモデルを適用するセンサーグラムを選択します。

Selected	Thumbnails タブで選択したセンサーグラム
Cleared	ステータスが Cleared の全センサーグラム
Flagged	ステータスが Flagged の全センサーグラム

↓

モデルの設定が終了したら、Fitting を実行します。

画面左上の **Fit** をクリックします。

Fitting を行うセンサーグラムを指定して **OK** をクリックします。

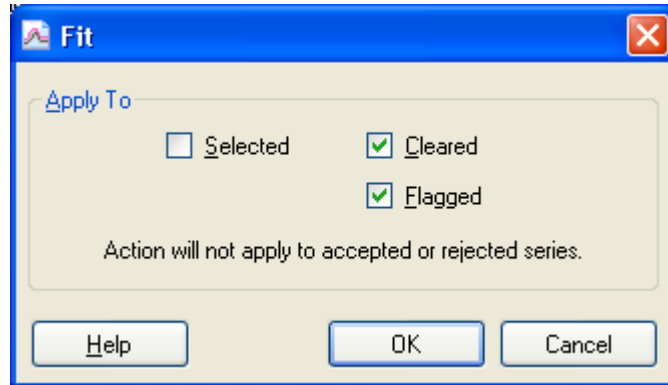
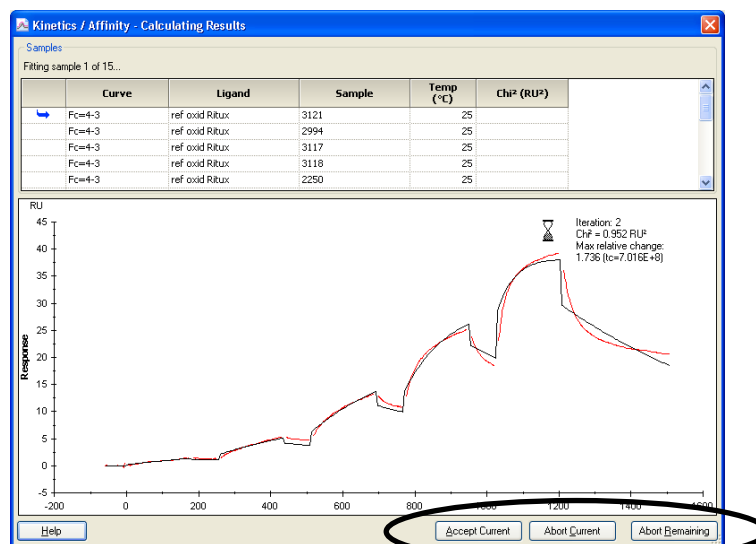
↓

Kinetics / Affinity - Calculating Results

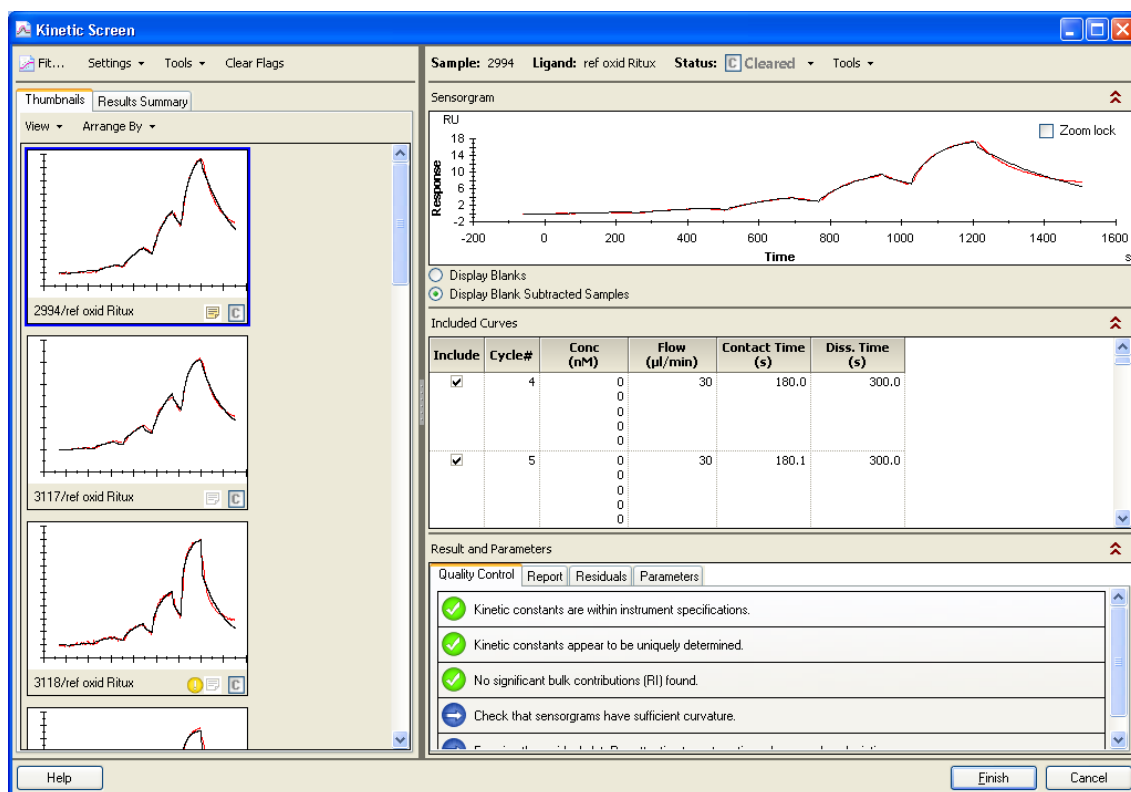
Samples

Fitting sample 1 of 15...

	Curve	Ligand	Sample	Temp (°C)	Chi² (RU²)
➥	Fc=4-3	ref oxid Ritux	3121	25	
	Fc=4-3	ref oxid Ritux	2994	25	
	Fc=4-3	ref oxid Ritux	3117	25	
	Fc=4-3	ref oxid Ritux	3118	25	
	Fc=4-3	ref oxid Ritux	2250	25	

Iteration: 2
Chi² = 0.952 RU²
Max relative change:
1.736 (tc=7.016E+8)

Help　Accept Current　Abort Current　Abort Remaining

Fitting が開始します。解析を行っているサンプルは、上の Table に ➥ が表示されます。Fitting の途中の解析を採用する場合は、右下の **Accept Current** をクリックします。Fitting の途中で解析を終了させる場合には、**Abort Current** をクリックします。解析しているサンプル以降の解析を中止する場合には、**Abort Remaining** をクリックします。

↓

全サンプルの解析が終了すると、解析結果が表示されます。

既存の 1:1 Binding モデルでは、解析結果の Quality Control 結果が表示されます。詳細内容は、Biacore T200 日本語取扱説明書　基本操作編　補足 5-10 をご参照ください。

Thumbnails タブのセンサーグラムにも Quality Control の結果が表示されます。問題がある場合には、マークが入ります。該当センサーグラムを選択して、画面右で詳細を確認します。

解析結果のステータス

Thumbnails タブで各センサーグラムの解析結果のステータスの設定を行います。

ここでは、次の 4 つのステータスを設定できます。

 Rejected　解析結果を採用しない

 Cleared　デフォルト設定

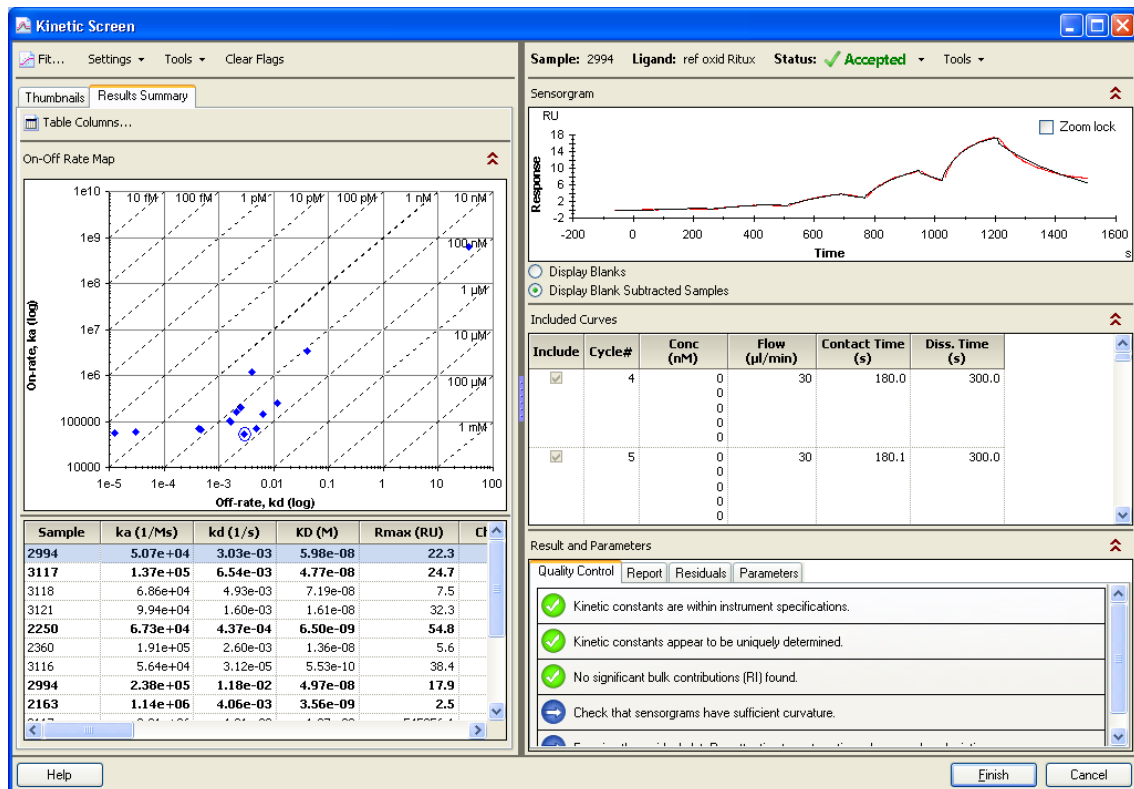
 Flagged　Flag を立てる

 Accepted　結果を採用する

ステータスを設定する場合には、画面左のセンサーグラムのをクリックして、ステータ

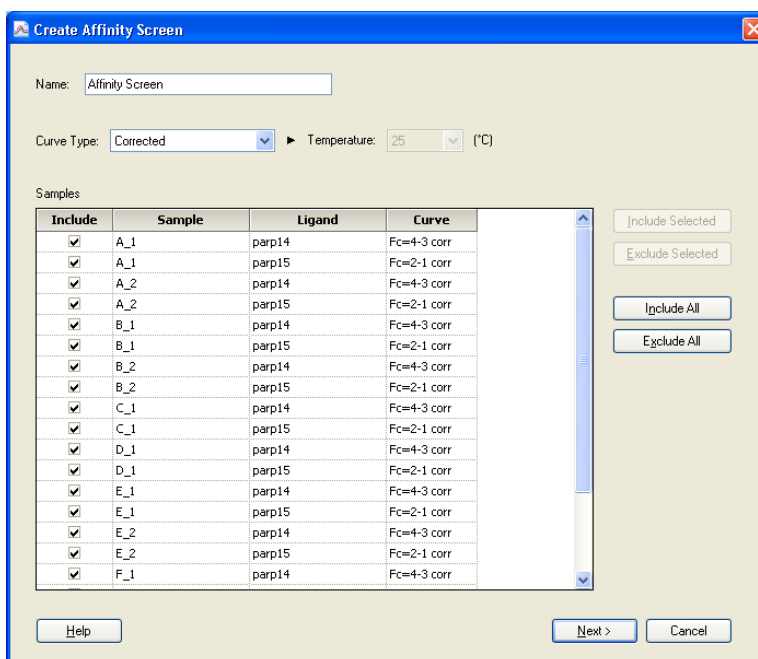
スを変更します。または、センサーグラム上で右クリックして、ステータスを選択します。
Thumbnails タブのセンサーグラムを選択後、画面右に表示されるセンサーグラム上の **Status** でも変更できます。

画面左上の **Tools→Hide Rejected** で、Reject したセンサーグラムを非表示にできます。
Clear Flags で、Flag を解除できます。
注釈・コメントを設定したい場合には、補足 2-2 をご参照ください。

Results Summary タブを選択すると、On-Off Rate Map を確認できます。
Table で解析結果、ステータス、注釈・コメントを確認できます。

On-Off rate Map を保存したい場合には、Map 上でマウス右クリック、**Copy Graph** で Paint または Word Pad に貼り付けて保存します。または、**Export Curves** で、テキスト形式で保存できます。

ウインドウ右下の **Finish** をクリックして、解析結果を最終化します。

↓

画面左の Screening フォルダ内に結果が追加されます。再解析を行う場合には、
Kinetic Screen 上で右クリック、**Edit** をクリックします。
Menubar の **File→Save as** で結果を保存します。

解析後のセンサーグラムと Table 情報を Export したい場合には、Thumbnails タブ内で、マウス右クリック、**Export All Graphs And Table** を選択して、保存先を指定します。フォルダが作成され、**Thumbnails** タブで表示されている全てのセンサーグラム（拡張子：png）と Table 情報（拡張子：txt）が Export されます。
引き続き、Affinity スクリーニングのデータ解析を行う場合には、2-2 に進みます。

2-2. Affinity スクリーニングのデータ解析

Tool bar の Screening をクリックし、Affinity Screen をクリックします。

↓

Name　　　　　解析結果の名前（必要に応じて変更します）
Curve Type　　サイクルタイプを選択します
Temperature　 温度を変えて測定している場合には、解析する温度を選択します
画面下の Table の Include で、解析に持ち込むサンプルにチェックを入れます。

↓

画面左に、ゼロ濃度を差し引いたセンサーグラムの一覧が表示されます。表示は、**View** の、**Small Thumbnails**、**Standard Thumbnails**、**Extended Thumbnails** で変更できます。並びは、**Arrange By** で変更できます。選択したセンサーグラムの詳細情報は画面右で確認できます。

ブランクサブトラクション、サンプルサイクルの選択

センサーグラム下の **Display Blanks** を選択すると、そのサンプル名のゼロ濃度センサーグラム（ブランク）が表示されます。画面下の Included Curves の を選択するとゼロ濃度サイ

クルとサンプルサイクルの一覧を確認できます。ここで、ゼロ濃度および解析に持ち込むサンプルの選択が可能です。**Include** のチェックを外すと、解析から除くことができます。ゼロ濃度サイクルが複数ある場合には、選択したゼロ濃度センサーグラムの平均が差し引かれます。なお、ゼロ濃度の測定を行っていない場合には、Table 下の **Blanks from other sample series** から選択することができます。

ステータスの設定

各センサーグラムのステータスを設定できます。
ここでは、次の 3 つのステータスを設定できます。

 Rejected　解析に持ち込まないセンサーグラム
（結合していない、乱れが大きいなど）

 Cleared　デフォルト設定、解析に持ち込むセンサーグラム

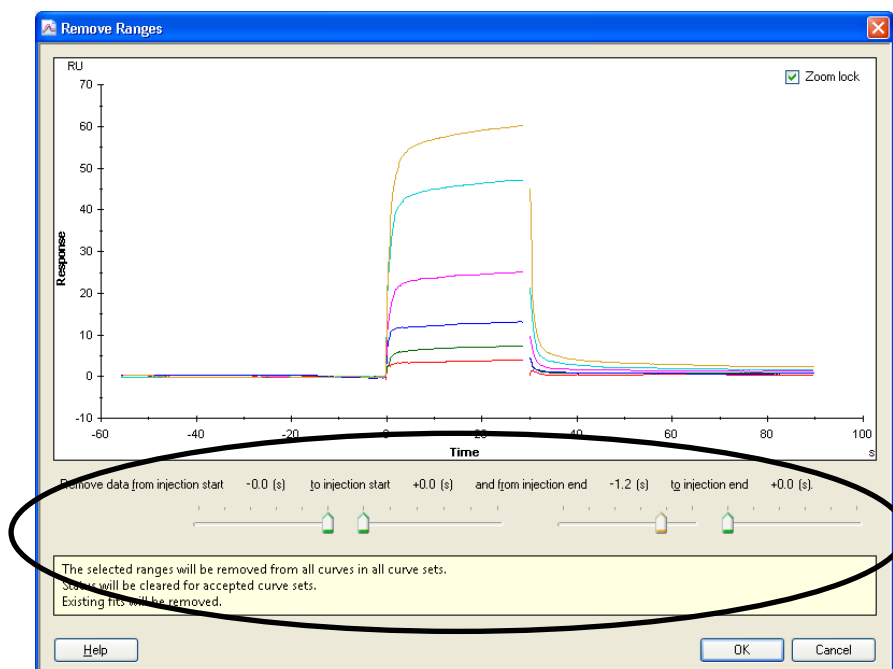
 Flagged　解析に持ち込むが、Flag を立てるセンサーグラム

ステータスを設定する場合には、画面左の各センサーグラムの をクリックして、ステータスを変更します。または、センサーグラム上で右クリックして、ステータスを選択します。

画面左上の **Tools→Hide Rejected** で、Reject したセンサーグラムを非表示にできます。
Clear Flags で、Flag を解除できます。
注釈・コメントを設定したい場合には、補足 2-2 を参照ください。

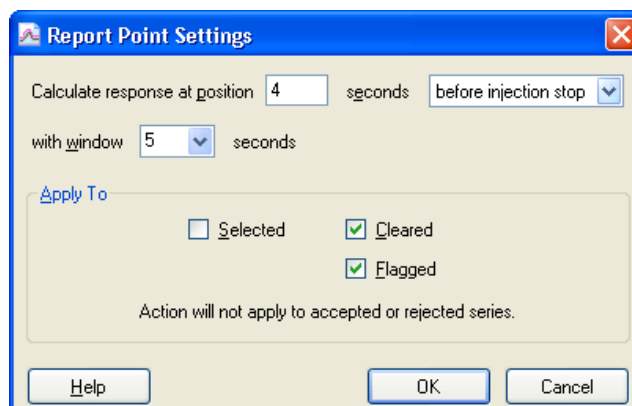
↓

添加開始・終了時のノイズを除きたい場合には、画面左上の **Tools→Remove Ranges** をクリックします。

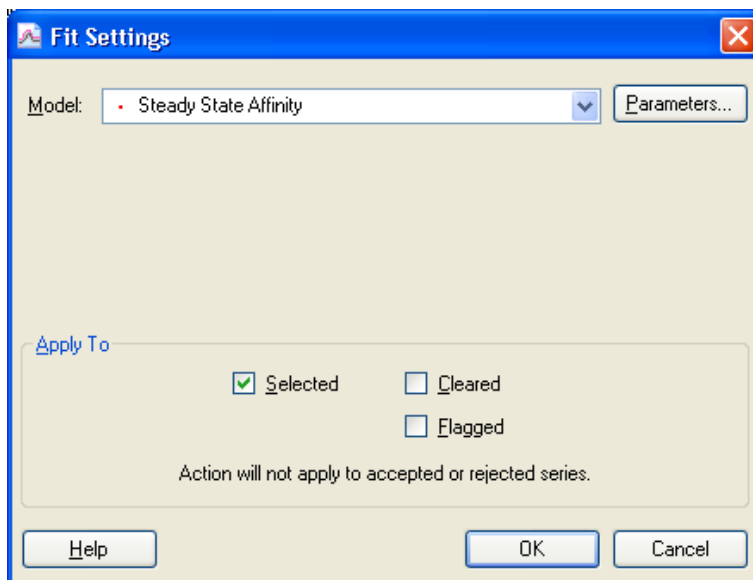
画面下のスライダーを動かして、解析から除く範囲を設定します。
OK をクリックすると、全てのセンサーグラムに設定した範囲が適用されます。

それぞれのセンサーグラムで、センサーグラムの領域削除を行いたい場合には、**Thumbnails** タブでセンサーグラムを選択後、右上の **Tools→Select Data** をクリックします。

センサーグラム上で、マウスの右クリック、ドラッグで範囲設定し **Remove Selection** を選択します。選択した領域が削除されます。**OK** をクリックします。

↓

Affinity 解析で用いる、レポートポイントの設定を行います。
画面左上の **Settings** の **Report Point Settings** をクリックします。

デフォルトでは、添加終了 4 秒前に設定されています。必要に応じて変更を行います。
Apply To で適用するセンサーグラムを選択します。**OK** をクリックします。

↓

解析モデルの設定を行います。
画面左上の **Settings→Fit Settings** をクリックします。

Model	解析モデルを選択します （モデルについては補足 2-3 を参照）
Parameters	選択したモデルの初期値、Fitting 方法などの変更ができます

Apply To で、選択したモデルを適用するセンサーグラムを選択します。

Selected	Thumbnails タブで選択したセンサーグラム
Cleared	ステータスが Cleared の全センサーグラム
Flagged	ステータスが Flagged の全センサーグラム

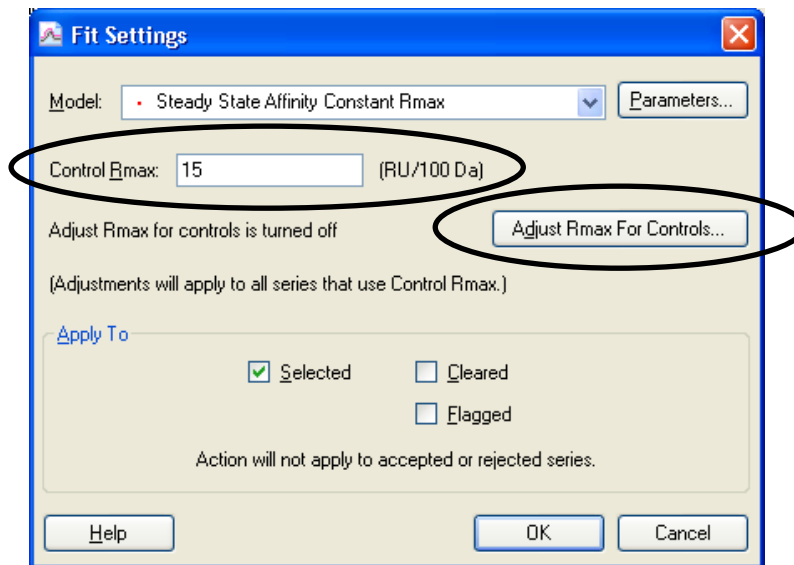
補足 2-3. Affinity スクリーニングの解析モデル

次の 3 つのモデルから選択できます。

Steady State Affinity

1:1 Binding モデルの Affinity 解析モデル。

Steady State Affinity Constant Rmax

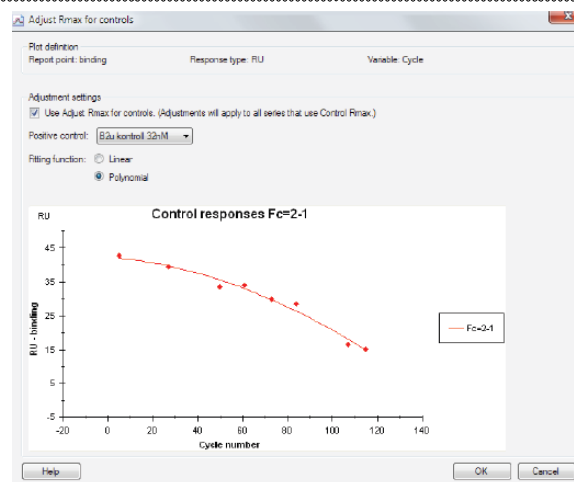
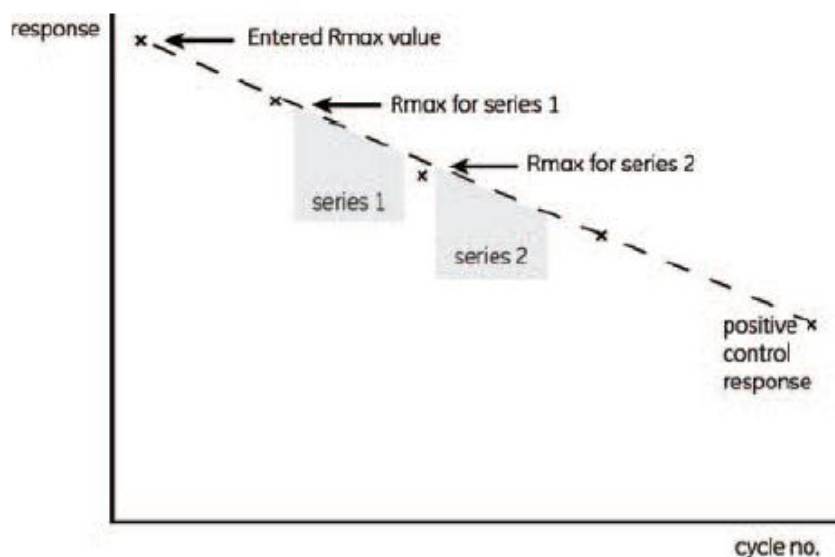
1:1 Binding モデルで、R_{max} を設定値で解析するモデル。
低アフィニティーでアナライト濃度を高濃度に設定できない場合に使用します。

設定する R_{max} 値は、ポジティブコントロールを R_{max} に到達する高濃度で添加して得られる結合量か、ポジティブコントロールの解析結果で得られた値を R_{max} として使用します。

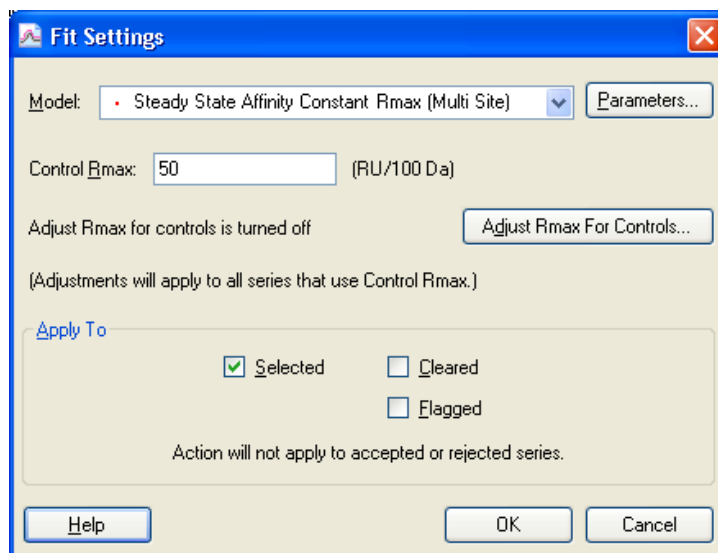
Control Rmax の欄に入力する値の単位は、RU/ 100 Da です。

例えば、ポジティブコントロールの結合量が 30 RU で分子量が 300 Da の場合には、Control Rmax の値は、結合量 × 100 / ポジティブコントロール分子量 = 30 RU × 100 / 300 Da = 30（RU / 100 Da）となります。

解析時には、アナライトの分子量差を次の式で補正した値を、各アナライトの R_{max} 値として適用します。

$$Rmax_{analyte} = ControlRmax \times \frac{MW_{analyte}}{100}$$

さらに、リガンドの活性低下を考慮した補正を行いたい場合は、**Adjust Rmax For Controls** をクリックして、補正に使用するポジティブコントロールを設定します。この際、設定するポジティブコントロールの R_{max} 値（**Control Rmax** に入力する値）は、サイクルはじめのポジティブコントロールの結合量（RU / 100 Da）を入力してください。

R_{max}の補正には、全サイクルのポジティブコントロールの結合量を **Linear** または **Polynomial** で Fitting して得られる補正曲線を使用します。各サンプルの濃度シリーズのはじめのサイクルに対応する補正曲線の Y 軸の値を **Control Rmax** 値として使用します。濃度シリーズ内ではその値を固定値とします。

Steady State Affinity Constant Rmax (Multi Site)

リガンド上に結合サイトが 2 つあることを想定したモデル。
高濃度で弱い親和性の結合が確認できる場合などに使用します。

Steady State Affinity Constant Rmax と同様に、**Control Rmax** の値（R_{max}の値）を設定します。（R_{max2}は変数として解析を行います。）必要に応じて、**Adjust Rmax For Controls** を使用します。

↓

モデルの設定が終了したら、Fitting を実行します。
画面左上の **Fit** をクリックします。

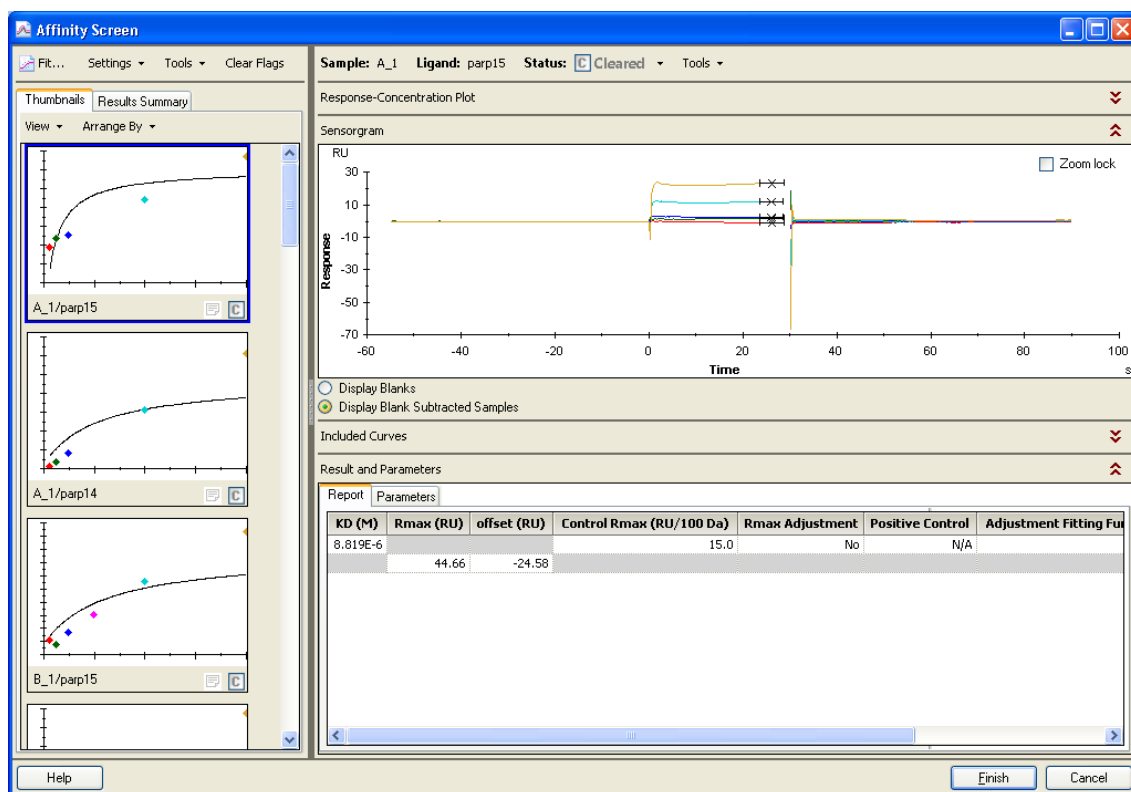
Fitting を行うセンサーグラムを指定して **OK** をクリックします。

↓

	Curve	Ligand	Sample	Temp (°C)	Chi² (RU²)
✓	Fc=2-1 corr	parp15	A_1	25	0.584
✓	Fc=4-3 corr	parp14	A_1	25	0.371
✓	Fc=2-1 corr	parp15	B_1	25	2.52
✓	Fc=4-3 corr	parp14	B_1	25	0.139
✓	Fc=2-1 corr	parp15	D_1	25	0.0632
✓	Fc=4-3 corr	parp14	D_1	25	0.0475
↪	Fc=2-1 corr	parp15	E_1	25	
	Fc=4-3 corr	parp14	E_1	25	
	Fc=2-1 corr	parp15	F_1	25	
	Fc=4-3 corr	parp14	F_1	25	
	Fc=2-1 corr	parp15	G_1	25	
	Fc=2-1 corr	parp15	H_1	25	
	Fc=4-3 corr	parp14	H_1	25	
	Fc=2-1 corr	parp15	A_2	25	
	Fc=4-3 corr	parp14	A_2	25	
	Fc=2-1 corr	parp15	B_2	25	
	Fc=4-3 corr	parp14	B_2	25	
	Fc=2-1 corr	parp15	C_1	25	
	Fc=4-3 corr	parp14	C_1	25	
	Fc=2-1 corr	parp15	E_2	25	
	Fc=4-3 corr	parp14	E_2	25	

Fitting が開始します。解析を行っているサンプルは、上の Table に ↪ が表示されます。
解析していないサンプルの解析を中断する場合には、**Abort Remaining** をクリックします。

↓

全サンプルの解析が終了すると、解析結果が表示されます。

Thumbnails タブで選択したプロットの結果を、画面右で確認できます。

解析結果のステータス

Thumbnails タブで各センサーグラムの解析結果のステータスを設定できます。
ここでは、次の 4 つのステータスを設定できます。

　Rejected　解析結果を採用しない

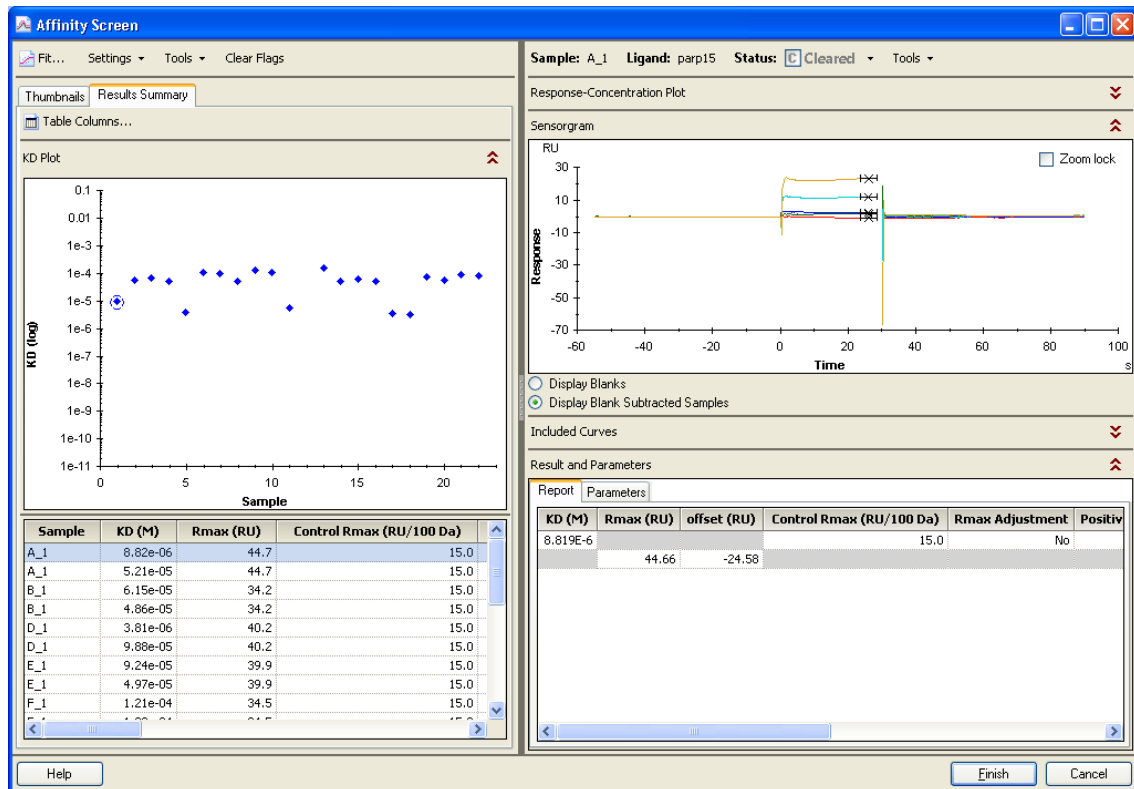
　Cleared　デフォルト設定

　Flagged　Flag を立てる

　Accepted　結果を採用する

ステータスを設定する場合には、画面左のプロットのをクリックして、ステータスを変更します。または、プロット上で右クリックして、ステータスを選択します。
Thumbnails タブのプロットを選択後、画面右に表示されるセンサーグラム上の **Status** でも変更できます。

画面左上の **Tools→Hide Rejected** で、Reject したセンサーグラムを非表示にできます。
Clear Flags で、Flag を解除できます。
注釈・コメントを設定したい場合には、補足 2-2 を参照ください。

Results Summary タブを選択すると、KD Plot を確認できます。
Table で解析結果、ステータス、注釈・コメントを確認できます。

KD Plot を保存する場合は、Plot 上でマウス右クリック、**Copy Graph** で Paint または Word Pad に貼り付けて保存します。または、**Export Curves** で、テキスト形式で保存できます。

ウインドウ右下の **Finish** をクリックして、解析結果を最終化します。

↓

画面左の Screening フォルダ内に結果が追加されます。再解析を行う場合には、
Affinity Screen 上で右クリック、**Edit** をクリックします。
Menubar の **File→Save as** で結果を保存します。
解析後のセンサーグラムと Table 情報を Export したい場合には、**Thumbnails** タブ内で、マウス右クリック、**Export All Graphs And Table** を選択して、保存先を指定します。フォルダが作成され、**Thumbnails** タブで表示されている全てのセンサーグラム（拡張子：png）と Table 情報（拡張子：txt）が Export されます。

解析メソッドの保存・実行

同じ内容で繰り返し測定・解析を行う場合には、設定した解析方法をメソッドとして保存して、次回の解析で使用することができます。
メソッドを保存する場合には、Menubar の **File→Save Evaluation Method As** を選択して保存先と保存内容を指定します。
メソッド使用時には、解析データを **File→Open** で呼び出し後、**File→Apply Evaluation Method** を選択してメソッドを呼び出します。

3. 低分子化合物アナライトの相互作用測定

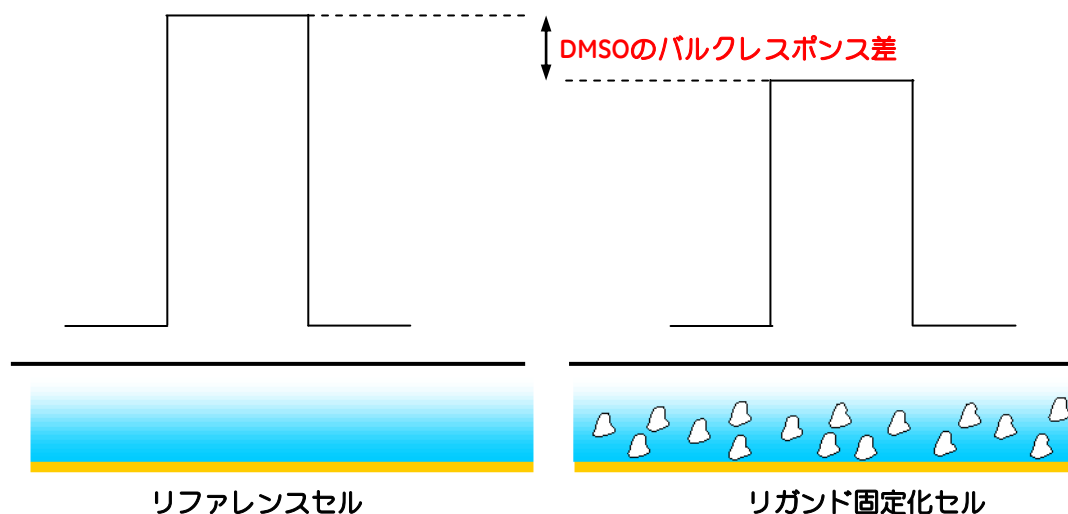
低分子化合物の溶解性の問題で有機溶媒を利用する場合には、一般的なタンパク質-タンパク質相互作用測定と異なり、ランニング緩衝液およびサンプル調製に注意が必要です。また、測定結果を評価するにあたり溶媒効果の補正が必要となります。
複数サンプルのスクリーニング、Kinetics/Affinity スクリーニングを実施する場合には、Biacore T200 日本語取扱説明書 応用編の 1、2 章をあらかじめ参照ください。

アナライトの調製
アナライト溶液の DMSO の終濃度をランニング緩衝液と合わせます。化合物濃度は結合スクリーニングが目的の場合、親和性にもよりますが数十 nM～数 μM で調製します。反応速度定数の算出が目的の場合、K_D（解離定数）値の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度以上調製します。

ランニング緩衝液
PBS や HEPES 緩衝液が広く使用されます。HEPES は、ヒト血清アルブミンや各種タンパク質への結合が見られます。この場合には、PBS などを使用してください。有機溶媒を使用する場合には、DMSO 含有緩衝液を使用することが多いです。DMSO 濃度は 5%程度以下を推奨します。DMSO 濃度はリガンドの活性や化合物の溶解性を考慮し決定します。ランニング緩衝液に使用できる DMSO 濃度は 10%までとなります。非特異的吸着を抑える目的で、終濃度 0.05%程度の界面活性剤（Surfactant P20 など）を添加することもあります。

補足 3-1. ランニング緩衝液調製の注意事項
・ランニング緩衝液は用事調製してください。
・DMSO を扱う際は、耐性がある材質の容器を使用します。（プラスチック容器は使用不可）
・DMSO を含む緩衝液をろ過する際には、フッ素樹脂製またはナイロン製のフィルター（0.22 μm）を用います。酢酸セルロース製のものは避けてください。
・DMSO 溶液中の混合物も測定に影響をおよぼす場合があるのでグレードの高いもの（UV spectrometry 用など）を使用してください。また、フレッシュなものを使用してください。
・DMSO 混合による pH 変動は大きいため、DMSO 混合後の pH を考慮してください。
・きれいなガラスボトルに保存し、装置にセットする直前までキャップはしっかり閉めてください。
・装置のボトルポジションにセットする際は必ず付属のスクリューキャップを使用してください。

溶媒補正

SPR のシグナルはセンサーチップ表面での様々な屈折率（RI）の変化を反映しています。センサーチップ表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の屈折率の差、すなわち、溶媒（バルク）効果レスポンスが含まれます。
溶媒効果が小さい（100 RU 以下）実験では、リガンド固定化セルからリファレンスセルのレスポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できます。
しかし、厳密には、リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されるため、リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも高くなります。

ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1%の違いは約 1,500 RU のバルクレスポンスに相当します。複数あるサンプルを個々に調製する際、DMSO 濃度の誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性があります。
このように、溶媒効果が大きい DMSO を用いる実験では、単純に差し引くだけではバルクレスポンスの差を十分に排除することはできません。実際、このバルクレスポンスの差は小さくても（通常 10 RU 以下)、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度であるため、バルクの差を補正する必要があります。

溶媒補正は以下の 3 つの要因が重複した際必要となります。

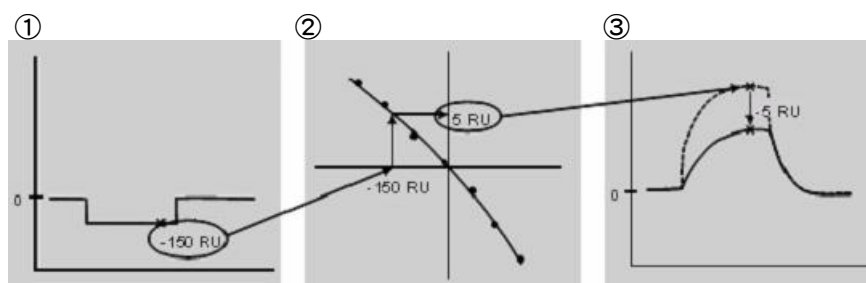
- 期待されるアナライトの結合レスポンスが小さい（100 RU 以下）場合
- リガンドを高密度（10,000 RU 以上）に固定化した場合
- サンプル溶液に DMSO が含まれるなど、バルクレスポンスが大きく（3000 RU 以上)、サンプル間で値が異なる場合（DMSO 濃度の“誤差”も含めて）

補足 3-2. 溶媒補正の方法

溶媒補正の手順

Biacore T200 Evaluation Software では、自動で以下の補正を実施します。

- 測定の際に、DMSO 溶液の濃度シリーズ（ランニング緩衝液に含まれる DMSO 濃度±1 %程度）を、リガンド固定化セルおよびリファレンスセルに添加し、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を記録します。
- リファレンスセルのレスポンスを x 軸、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を y 軸にプロットして溶媒補正用曲線を作成します。
- 低分子化合物を添加した際、リファレンスセルのレスポンス（図①）を溶媒補正用曲線に代入して、補正値を算出します（図②）。
- 相互作用測定で得られた結合レスポンスから補正値を差し引きます（図③）。

① ② ③

溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

5 % DMSO 含有サンプルを用いる場合の溶媒補正用 DMSO 溶液の作成方法を記載します。すべての DMSO 溶液は用事調製します。

①1x PBS（no DMSO）を調製します。

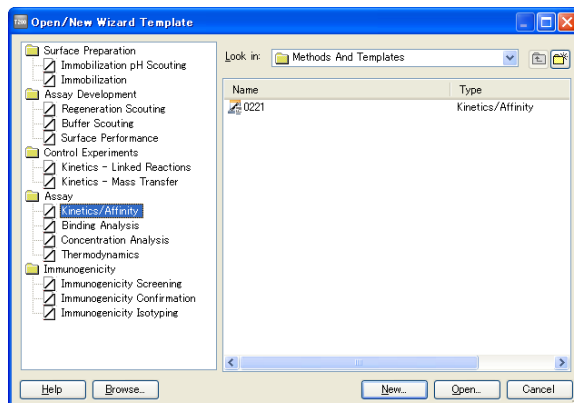
②溶媒補正用曲線 4 %、6% DMSO ストック溶液を調製します。

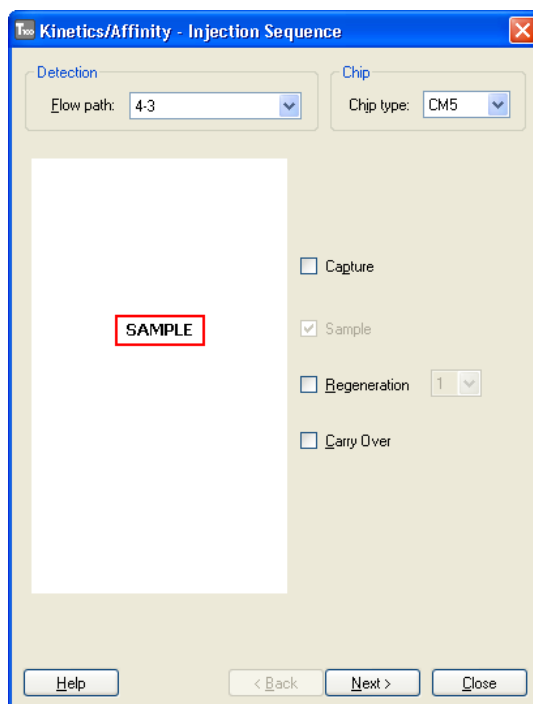
4% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9600 µl
	100 % DMSO	400 µl
		10000 µl
6% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9400 µl
	100 % DMSO	600 µl
		10000 µl

③ストック溶液を下記表の割合で混合して、4 %～6 %の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製します。以下の表は 8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する際のプロトコールです。

4% DMSO		100	200	300	400	500	600	700	
6% DMSO	700	600	500	400	300	200	100		
	700	700	700	700	700	700	700	700	(µl)

3-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン( )または Menu bar の **Run→Wizard** をクリックします。

Assay→Kinetics/Affinity を選択した後、New...をクリックします。(4 つのセルを使用する場合や、Binding Analysis を行う場合にはテンプレートのメソッドを使用します。)
以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、Open をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、Browse をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして Open をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path 2-1 もしくは 4-3 を選択します

Chip

Chip type 利用するセンサーチップを選択します

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされます。

Sample

アナライトの添加コマンドです

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数の選択が可能です（1 or 2）

Carry Over

アナライトのキャリーオーバーを確認する場合にチェックを入れます

Next >をクリックします。

↓

Conditioning

Solution 再生溶液または緩衝液の名称

contact time 添加時間（s）

Number of injections 添加回数

Startup

Solution 指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施します。通常は、ランニング緩衝液を

用います。

Number of cycles　サイクル数を設定します。3 回以上を推奨します。

Solvent correction

溶媒補正を実施する場合にチェックを入れます。

Number of injections　溶媒補正の測定点を選択します。何サンプルごとに溶媒補正を実施するかを、”Repeat after ［　　］ Sample cycles”で指定します。

Next >をクリックします。

↓

Sample

contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Dissociation time	解離時間	120 s

Extra wash after injection with

アナライト添加後に、指定した溶液でフローセル以外の流路を洗浄したい場合にチェックを入れます。センサーチップ表面には流れません。

Stabilization period　添加後のベースライン安定化時間　0 s
（必要に応じて設定します。）

入力後、**Next** をクリックします。

↓

Sample id	アナライトの名称
MW　(Da)	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 µg/ml”を換算します。

コントロールサンプルを定期的に添加する場合は、**Control Samples** をクリックします。

Control Sample definition

　コントロールサンプルを測定する場合に Run control Samples にチェックを入れます。

　Repeat control Sample（s） every　何サンプルごとにコントロールサンプルを測定するか指定します。

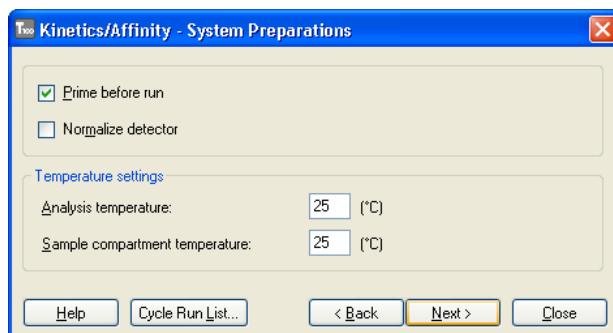
Control Samples

　テーブルにコントロールサンプルの情報を入力します。

入力後、**Next** をクリックします。

補足 3-3. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力します。

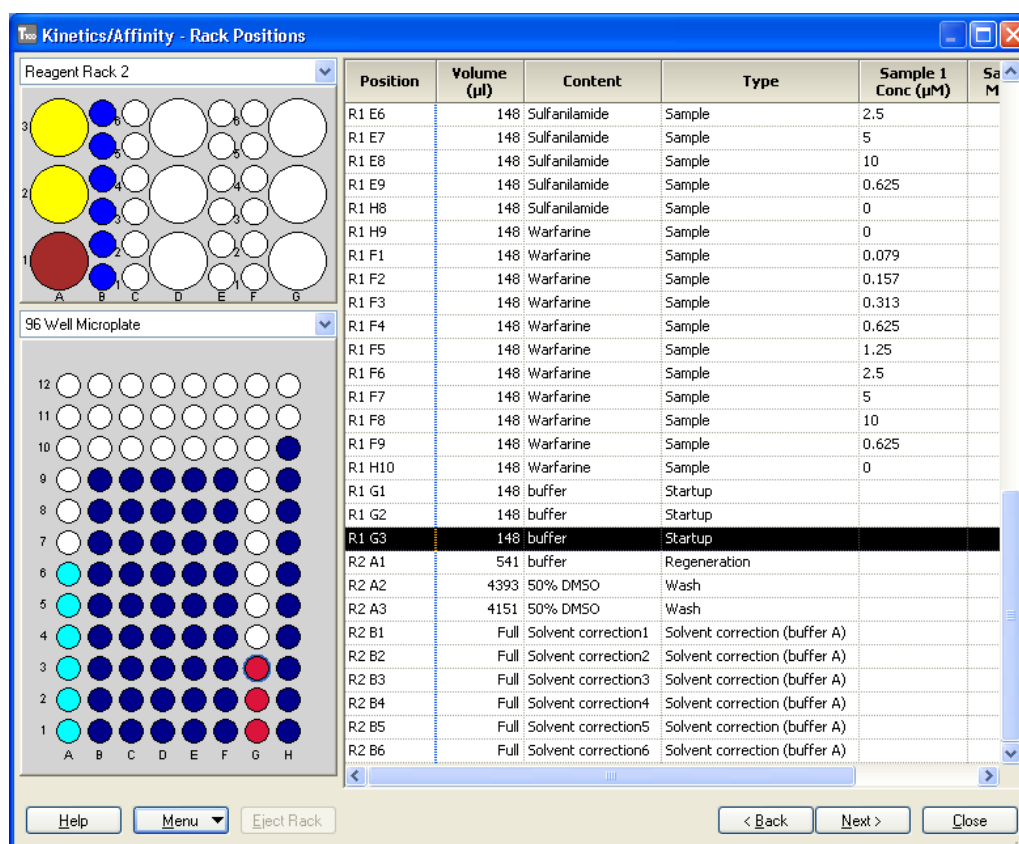
↓

測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

Temperature settings

Analysis temperature	25℃
Sample compartment temperature	25℃

Cycle Run List をクリックすると、測定サイクルのリストが表示されます。

Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (μM)	Sample 1 MW (Da)
1	Startup	buffer		
2	Startup	buffer		
3	Startup	buffer		
4	Solvent correction			
5	Control Sample	CBSA	50	
6	Sample	Sulfanilamide	0	
7	Sample	Sulfanilamide	0	
8	Sample	Sulfanilamide	0.0079	
9	Sample	Sulfanilamide	0.157	
10	Sample	Sulfanilamide	0.3131	
11	Sample	Sulfanilamide	0.625	
12	Sample	Sulfanilamide	1.25	
13	Sample	Sulfanilamide	2.5	
14	Sample	Sulfanilamide	5	
15	Sample	Sulfanilamide	10	
16	Sample	Sulfanilamide	0.625	

Next をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置と容量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

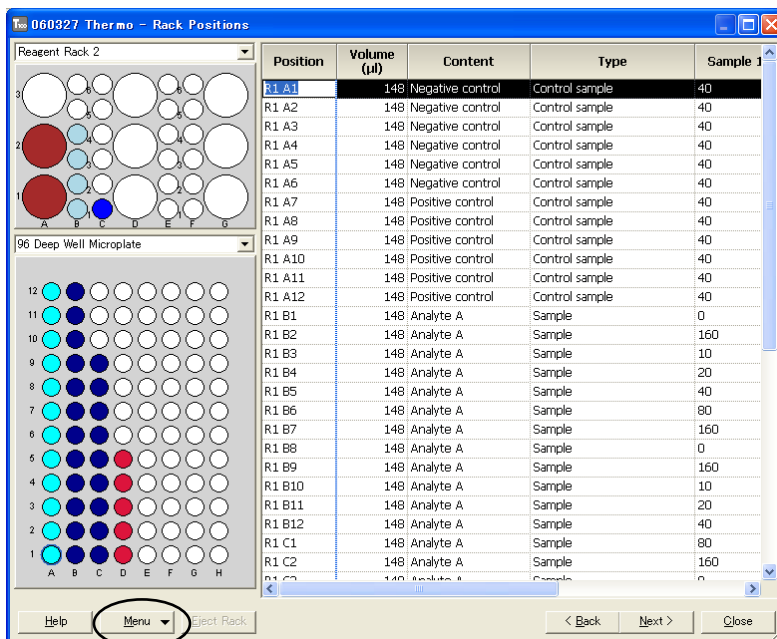
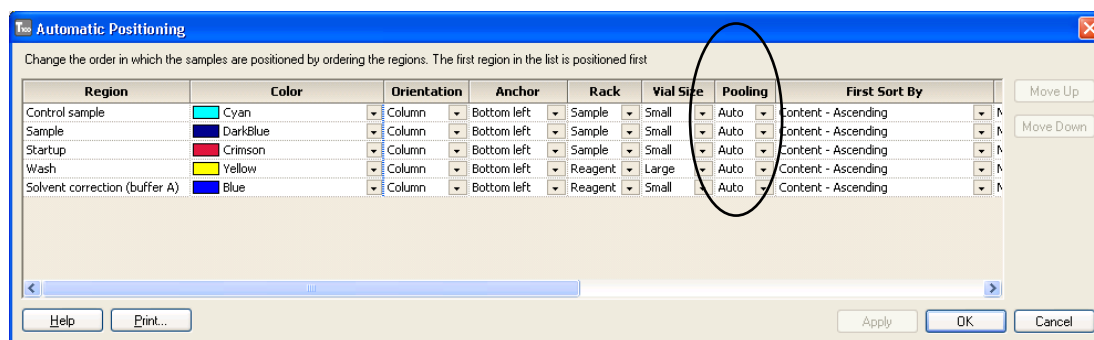
補足 3-4. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu→Export Positions を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu→Sample Position Import でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

補足 3-5. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。

Menu から Automatic Positioning…を選択します。

↓

ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することが出来ます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の **Next** をクリックします。

↓

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。

Start をクリックします。

↓

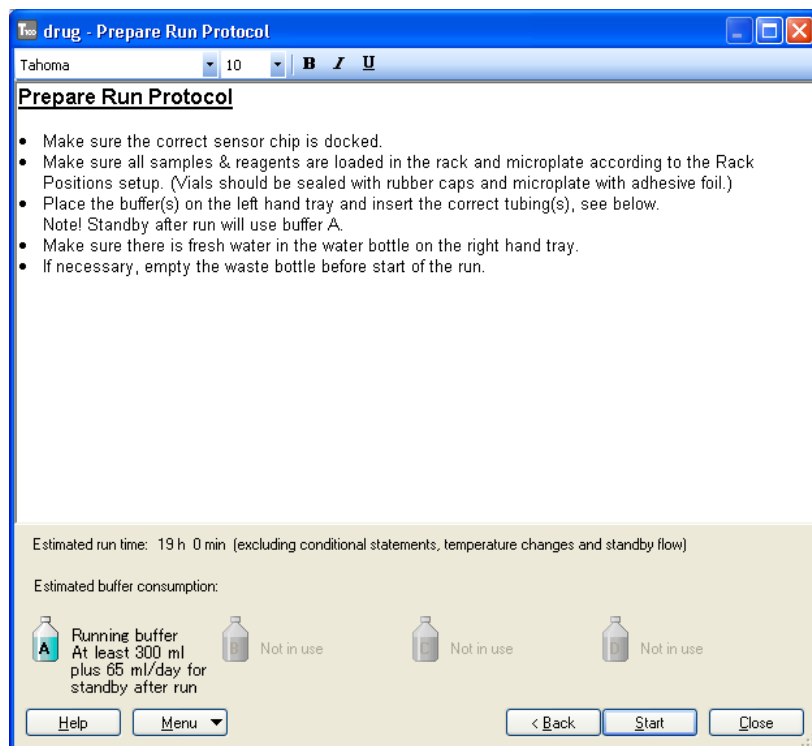
設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

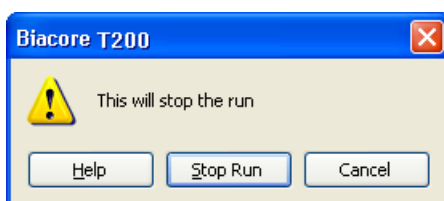
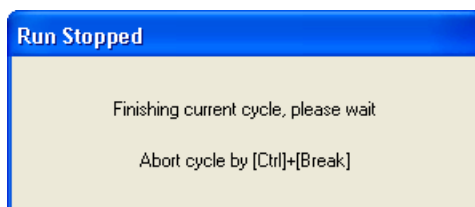
Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動します。

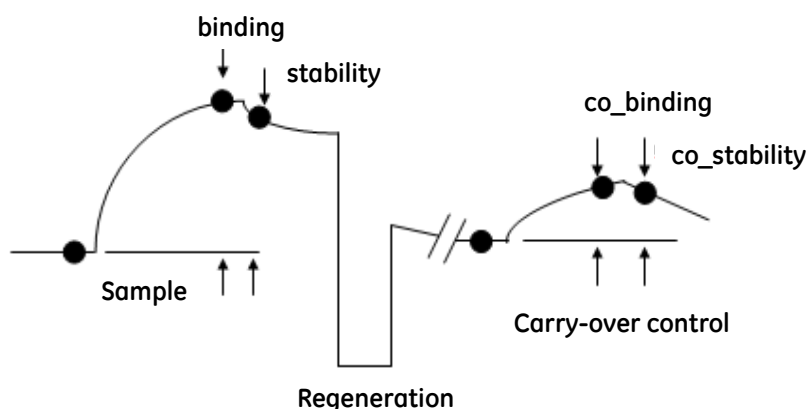
補足 3-6. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。

ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

補足 3-7. レポートポイントの設定

溶媒（バルク）補正を必要とする実験では、低分子アナライトのバルクレスポンスを測定するために、アナライト添加中（添加終了直前）にレポートポイントを取得する必要があります。自動取得されるレポートポイントの名前は binding と付いています。添加終了直後のレポートポイントは stability として取得されます。また、低分子アナライト特有のニードル、流路等へのキャリーオーバーチェックのために、アナライト添加終了後、ランニング緩衝液をアナライトと同等のモードで添加する際に取得されるレポートポイントの名前は、頭に co-が付いています。

補足 3-8. キャプチャー法を利用した低分子化合物の測定

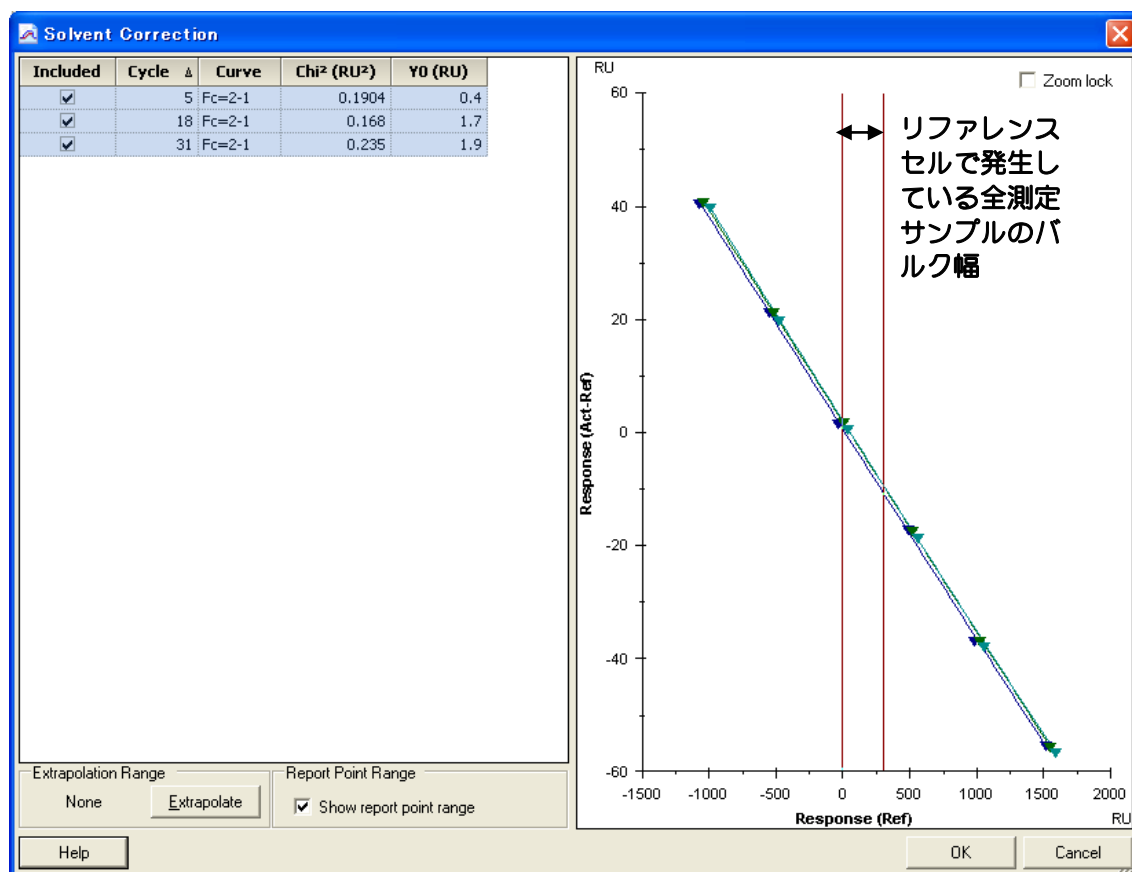
Wizard の Binding analysis および Kinetics / Affinity では、溶媒補正曲線の測定を、リガンドをキャプチャーせずに実施します。リガンドキャプチャー後のベースラインドリフトが小さく、一度リガンドをキャプチャーした表面で連続してアナライトの測定を実施する場合には、Wizard のキャプチャー機能を利用した測定が実施できます。

ただし、キャプチャー後のベースラインドリフトが大きく、アナライトごとにリガンドをキャプチャーする場合は、溶媒補正曲線の測定はリガンドキャプチャー後の表面で実施してください。この際、測定プログラムはメソッドで作成する必要があります。メソッド作成については、Biacore T200 日本語取扱説明書 基本操作編 6 章を参照してください。

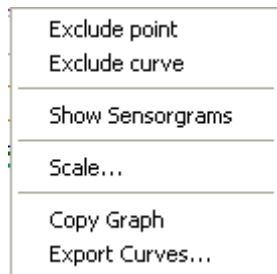
3-2. データ解析

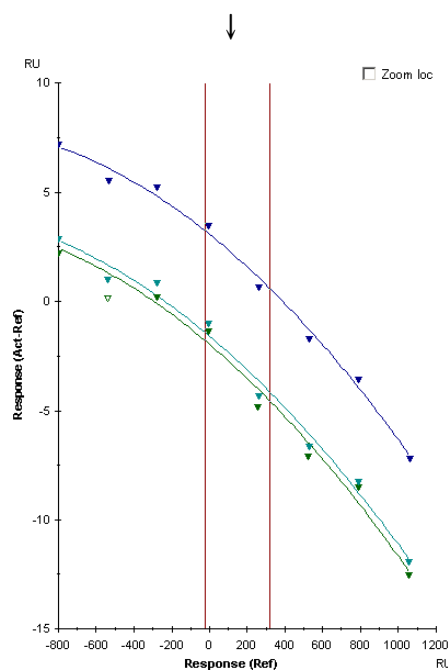
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。
スクリーニング、反応速度定数・解離定数算出は、溶媒補正実施後に解析に進みます。解析方法は、Biacore T200 日本語取扱説明書 基本操作編 を参照してください。複数サンプルのスクリーニング、Kinetics/Affinity スクリーニングを実施する場合には、Biacore T200 日本語取扱説明書 応用編の 1、2 章を参照ください。
ここでは、溶媒補正方法までをご紹介します。

溶媒補正

Evaluation → Add Solvent correction…をクリックします。
測定サイクル中の溶媒補正用曲線が表示されます。

画面左で使用する補正曲線にチェックを入れ、**OK** をクリックすると補正が完了します。
溶媒補正用曲線は、Evaluation Explorer 中の **Solvent Correction** フォルダに追加保存されます。
センサーグラムおよびプロットで、補正後のデータを呼び出す際には、Curve Name リストから、末端に corr が付いたものを選択します。例：Fc2-1 corr。

補足 3-9. 測定ポイントの削除

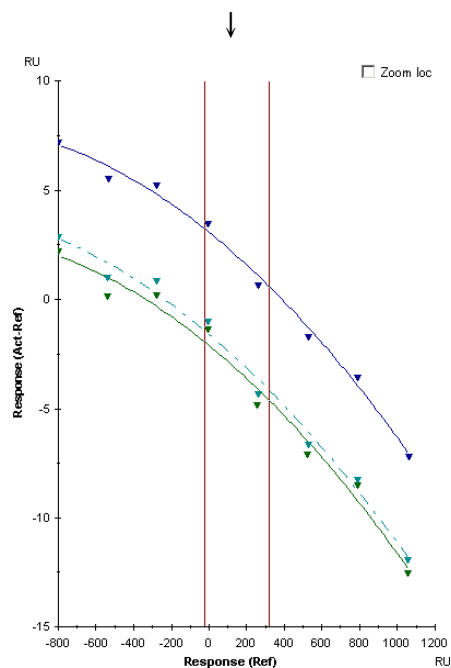
エアーの混入などの理由で、溶媒補正用曲線から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックします。

Exclude point をクリックします。

↓

測定ポイントが削除されます。同時に、改めて残りの測定ポイントで溶媒補正用曲線が作成されます。

補足 3-10. 溶媒補正用曲線の削除

エアーの添加などの理由で解析から削除したい溶媒補正用曲線がある場合、目的の溶媒補正用曲線について、Solvent correction 左の Table の **Include** カラムのチェックを外します。

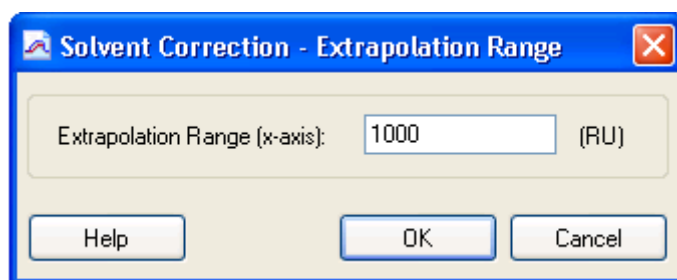
Included	Cycle	Curve	Chi² (RU²)	Y0 (RU)
☑	4	Fc=4-3	0.2299	3.1
☑	25	Fc=4-3	0.5779	-2.1
☐	30	Fc=4-3	0.4273	-1.6

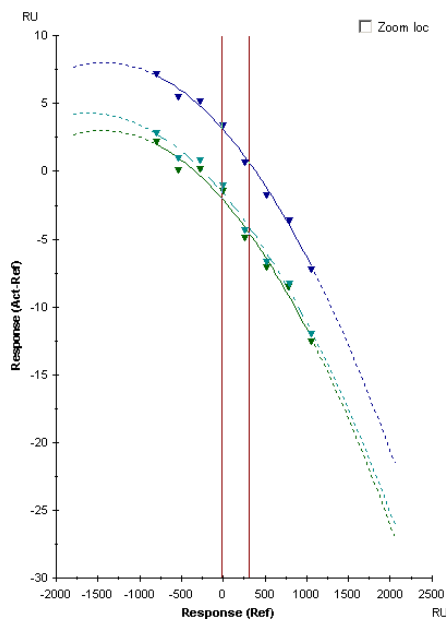
↓

チェックを外した溶媒補正用曲線が削除されます。

補足 3-11. 溶媒補正用曲線の延長

サンプルもしくは溶媒補正用 DMSO 溶液の調製の問題で、測定サンプルのバルクレスポンスが溶媒補正用 DMSO 溶液の範囲内に収まらなかった場合に、溶媒補正用 DMSO 溶液の濃度幅（＝リファレンスセルに対するバルク幅）を広げることができます。ただし、延長された溶媒補正用曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため補正値の取扱いには注意が必要です。

Solvent correction 左下の **Extrapolate** をクリックします。

↓

延長する幅を入力します。実際の溶媒補正用曲線の測定幅の 10 %を超えないことが望ましいです。**OK** をクリックします。

↓

データの評価

溶媒補正を実施後に解析に進みます。

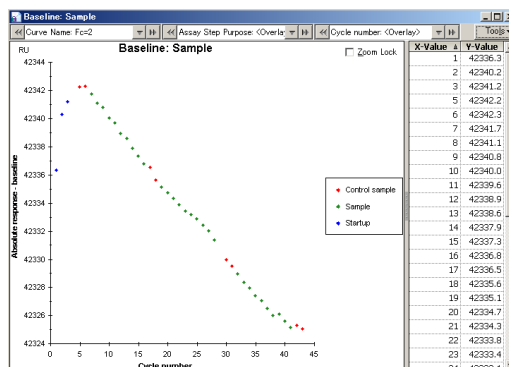
複数サンプルのスクリーニングの評価は、Biacore T200 日本語取扱説明書 応用編の 1 章を参照ください。Kinetics/Affinity スクリーニングを実施する場合には、2 章を参照ください。

補足 3-12. 測定結果の正当性の評価

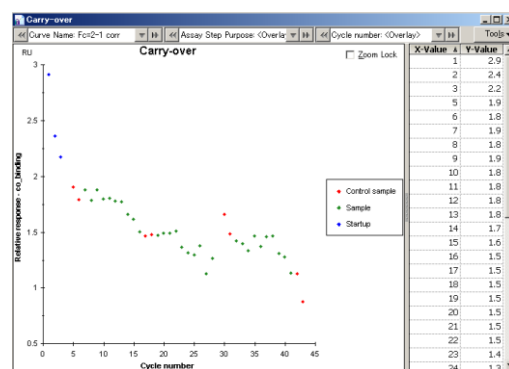
Evaluation Explorer の Plot を用いて、得られたデータの信頼性があるかを評価します。

ベースラインの変動

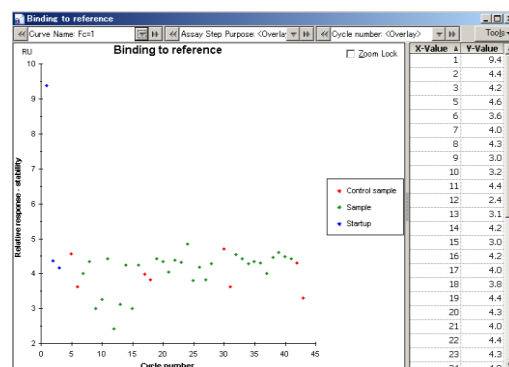
Baseline: Sample プロット

全測定サイクルの baseline の絶対値に対するプロットが表示されます。物理吸着しているリガンドがサイクルごとに脱離している場合、右肩下がりになりますが、ポジティブコントロールサンプルのレスポンスが確認できていれば問題ありません。ポジティブコントロールがない場合、全サイクルの総変動量（RU）が固定化量の10%以上である場合には、その点を考慮して評価する必要があります。

キャリーオーバーチェック

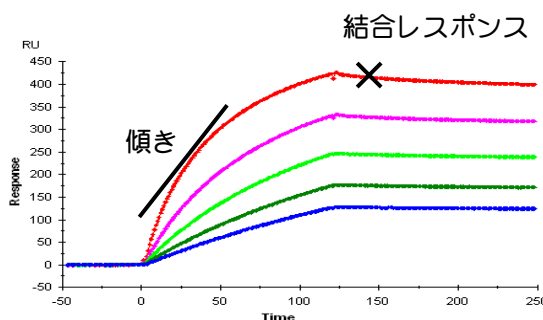
Carry Over プロット

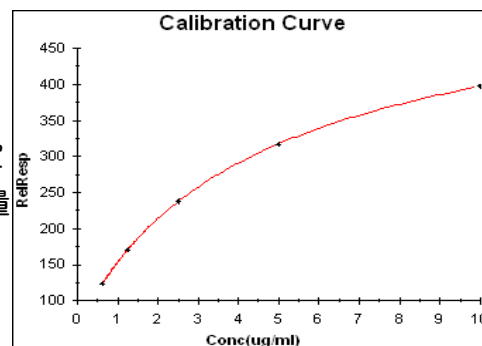
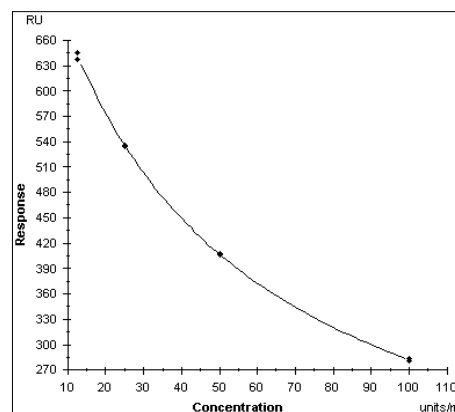
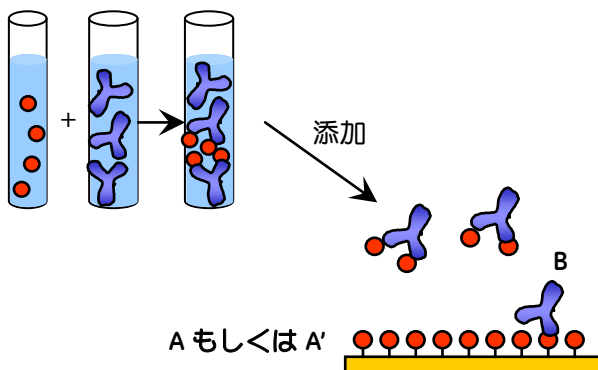
co_binding の co_baseline に対する相対値プロットが表示されます。ランニング緩衝液のレスポンス（画面では Startup サイクル）に対して、レスポンスの大きいアナライトはニードルや流路などに吸着する性質を持ちます。キャリーオーバーが激しいアナライトの次サイクルの結合レスポンスは、それを考慮して評価する必要があります。

リファレンスセルへの非特異吸着の確認

Binding to reference プロット

Stability の baseline に対する相対値のプロットが表示されます。ランニング緩衝液のレスポンスを基準として評価します。ランニング緩衝液のレスポンス以上のサンプルは、センサーチップ表面へ非特異的に吸着している可能性があります。それを考慮した上で評価してください。

4. 濃度測定

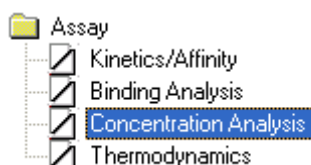
4-1. 検量線を利用した濃度測定

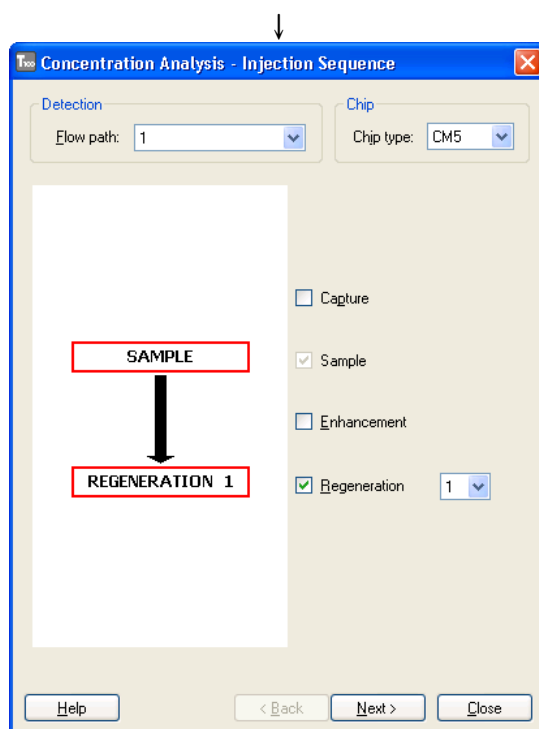
Biacore による濃度測定では、定量したい分子（A）に対して親和性を持つ分子（B）が必要となります。B を固定化したセンサーチップ表面に A を添加すると、添加した濃度に依存した結合レスポンス（RU）が得られます。数段階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポンスを得て、検量線（RU vs C）を作成します。濃度未知の A に対しても同様に添加し、その結合レスポンスを検量線にフィッティングすることにより濃度を算出します。
また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き (Slope) も、結合レスポンス同様に添加している A の濃度を反映した値となるため、Slope vs C の検量線からでも定量をすることができます。

直接法と阻害法

親和性を持つ分子（B）をセンサーチップ表面に固定化し、定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法を直接法と呼びます。それに対し、化合物やペプチドなど分子量が小さい分子を定量する場合は A もしくは A のアナログ（A'）をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和性を持つ分子 B を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を定量することにより、混合液中に存在する A を逆算する定量法を阻害法と呼びます。

直接法の検量線

阻害法の検量線

4-1-1. プログラムの実行

濃度測定では、原則としてリファレンスセルを設定しません。評価に用いる結合量として、溶液効果の影響を受けない解離領域における結合量を利用するためです。なお、非特異的吸着を差し引く目的で、リファレンスセルを設定する場合には、あらかじめウィザードの Concentration Analysis のテンプレートで作成したメソッドをメソッドビルダーで開き、リファレンスセルを設定して測定を実施してください。

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Wizard** をクリックします。

Assay → **Concentration Analysis** を選択した後、**New** をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open** をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse** をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open** をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　　目的のフローセルを選択します。リファレンスセルの差し引きはできません。

Chip

Chip type　　利用するセンサーチップを選択します。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。

Sample

アナライトの添加コマンドです

Enhancement

2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れます

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数を選択してください。（1 or 2）

Next >をクリックします。

↓

Startup

指定した溶液（通常、ランニング緩衝液）で、サンプル測定と同様の工程をサンプル（アナライト）測定前に実施します。

Solution　　溶液名

Number of cycles　　サイクル数。3 回以上を推奨します。

Next >をクリックします。

↓

Sample

contact time	アナライトの添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Mix with	チェックを入れると、測定直前にサンプルと混合溶液を自動混合します(阻害法による定量の場合に使用します)。Fraction に混合後の溶液に対する、混合溶液の割合（%）を入力します。 （例）75%と入力した場合：サンプル 25%、混合溶液75%

Regeneration

Solution	再生溶液の名称
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合はチェックを入れます。
contact time	再生溶液の添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Stabilization period	添加終了後のベースライン安定化時間（s）

Next >をクリックします。

↓

Calibration Curve

Analyte name	アナライト（既知濃度サンプル）の名称
Run first	検量線測定を測定の初めに実施するよう予め設定されています。
Repeat calibration every	検量線作成頻度。 指定したサンプル数ごとに検量線を実施します。チェックを入れない場合には、サンプル測定前に 1 度検量線を測定します。
Run last	検量線測定を測定の最後に実施するかを設定します。

Calibration points

Concentration	単位をプルダウンで選択して、濃度を入力します。 6 段階濃度以上、測定回数 2 回以上の繰り返し測定を推奨します。 テーブルに入力した順番で測定は実行します。

Next をクリックします。

↓

Control Sample definition

　　Run control Samples

　　　　コントロールサンプルを測定する際にチェックします

　　Repeat control Sample（s） every

　　　　測定頻度を入力します

　　　　コントロールは 20 サンプル程度ごとに入れます

Control Samples

　　Control Sample id　　コントロールサンプルの名称

　　Expected conc.　　コントロールサンプルの濃度

Next をクリックします。

↓

Sample id　　サンプルの名称

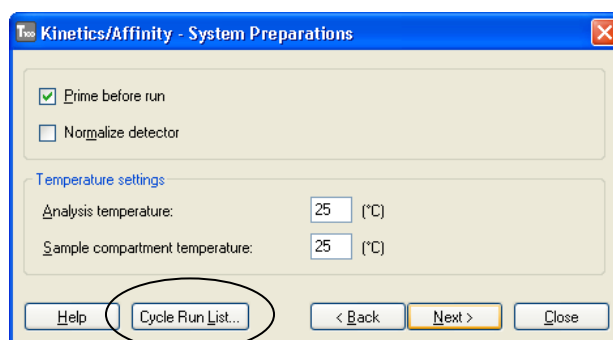
Dilution factor　　サンプルの希釈倍率

テーブルに入力した順番で測定します。

Next をクリックします。

↓

補足 4-1. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力します。

測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

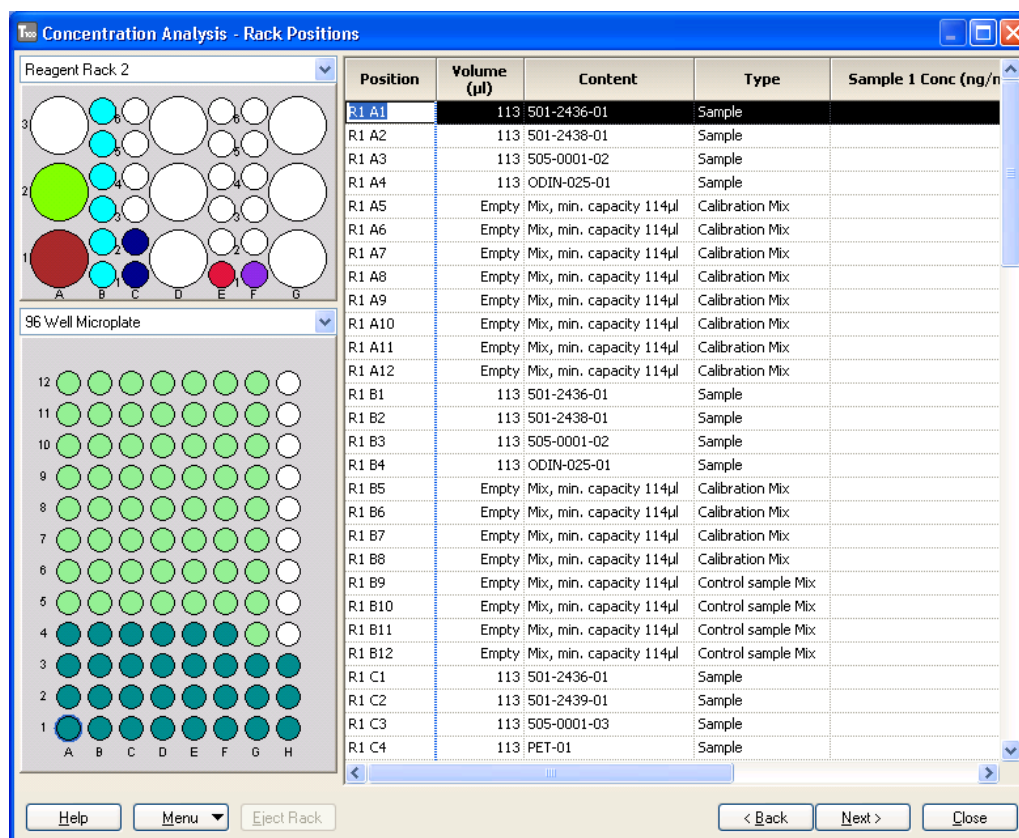
Analysis temperature　　25 ℃

Sample compartment temperature　　25 ℃

Cycle Run List をクリックすると、測定サイクルを確認できます。

Concentration Analysis - Cycle run list

Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (ng/ml)	Sample 1 Dilution
1	Startup	Dummy		
2	Startup	Dummy		
3	Startup	Dummy		
4	Calibration	Biotin	100	
5	Calibration	Biotin	40	
6	Calibration	Biotin	16	
7	Calibration	Biotin	6.4	
8	Calibration	Biotin	2.56	
9	Calibration	Biotin	1.02	
10	Control Sample	Control 1	33.3	
11	Control Sample	Control 2	11.1	
12	Sample	501-2436-01		1
13	Sample	501-2436-01		1

Next をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 4-2. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu→Export Positions を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu→Sample Position Import でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

補足 4-3. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。

Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓

ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

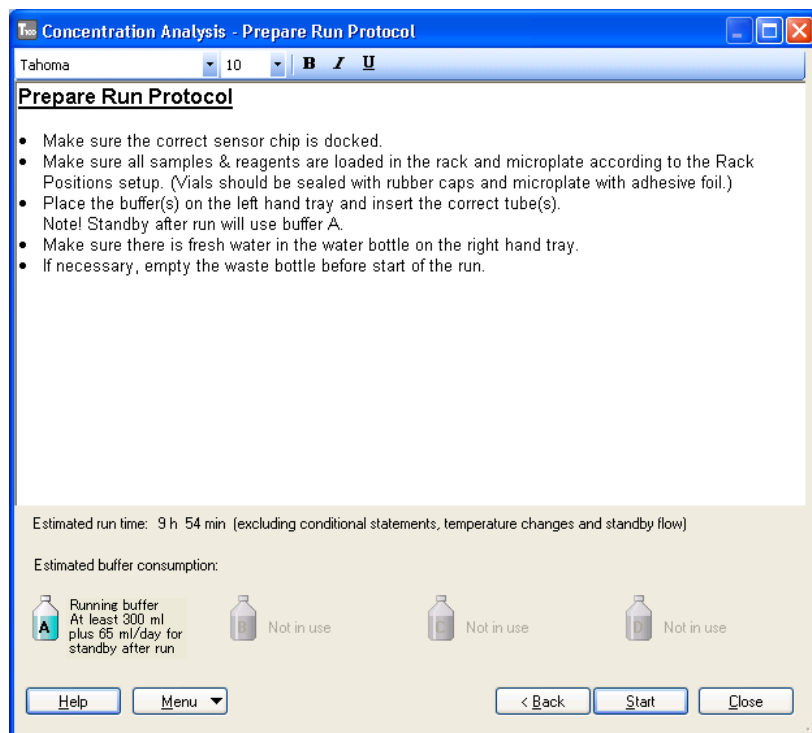
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の **Next** をクリックします。

↓

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液の量が表示されます。

Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

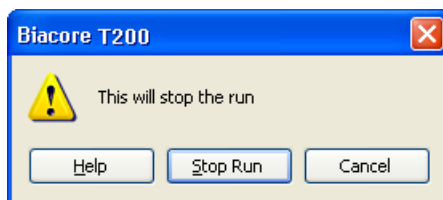
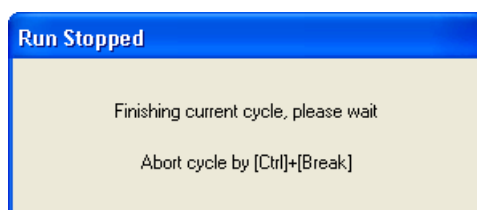
↓

終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 4-4. プログラムの緊急停止

Run→Stop Run をクリックします。

ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓

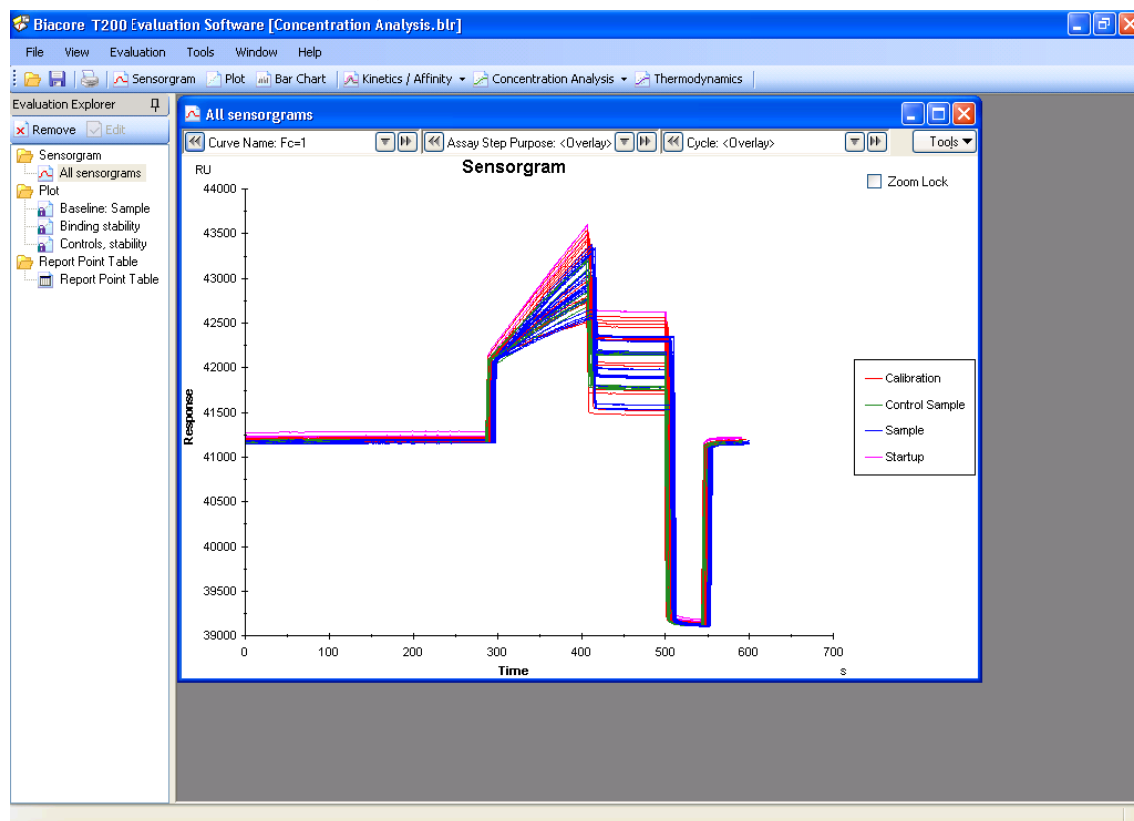
Run Stopped

Finishing current cycle, please wait

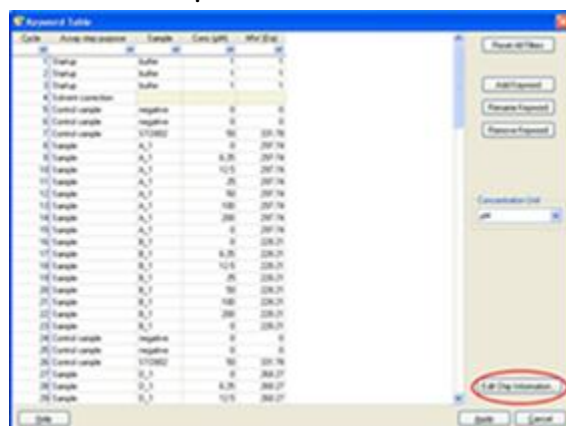
Abort cycle by [Ctrl]+[Break]

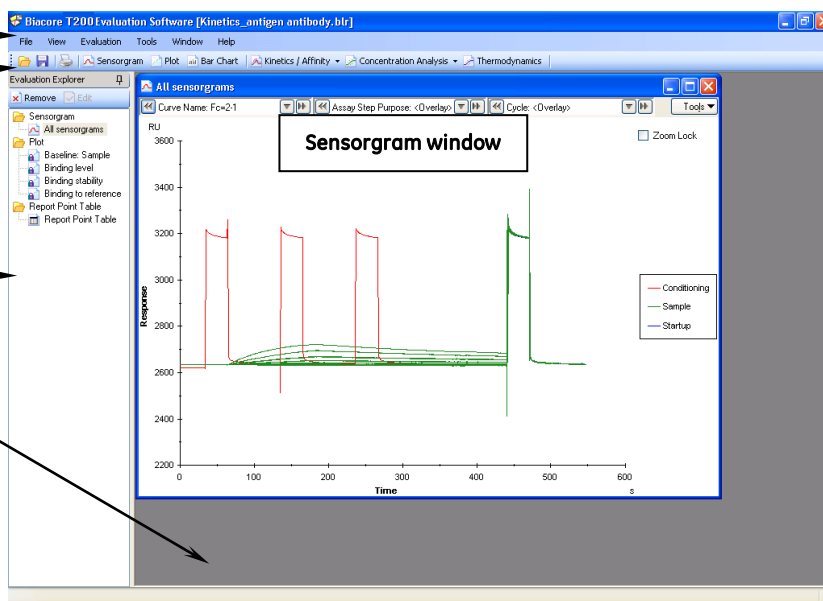
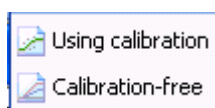
実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

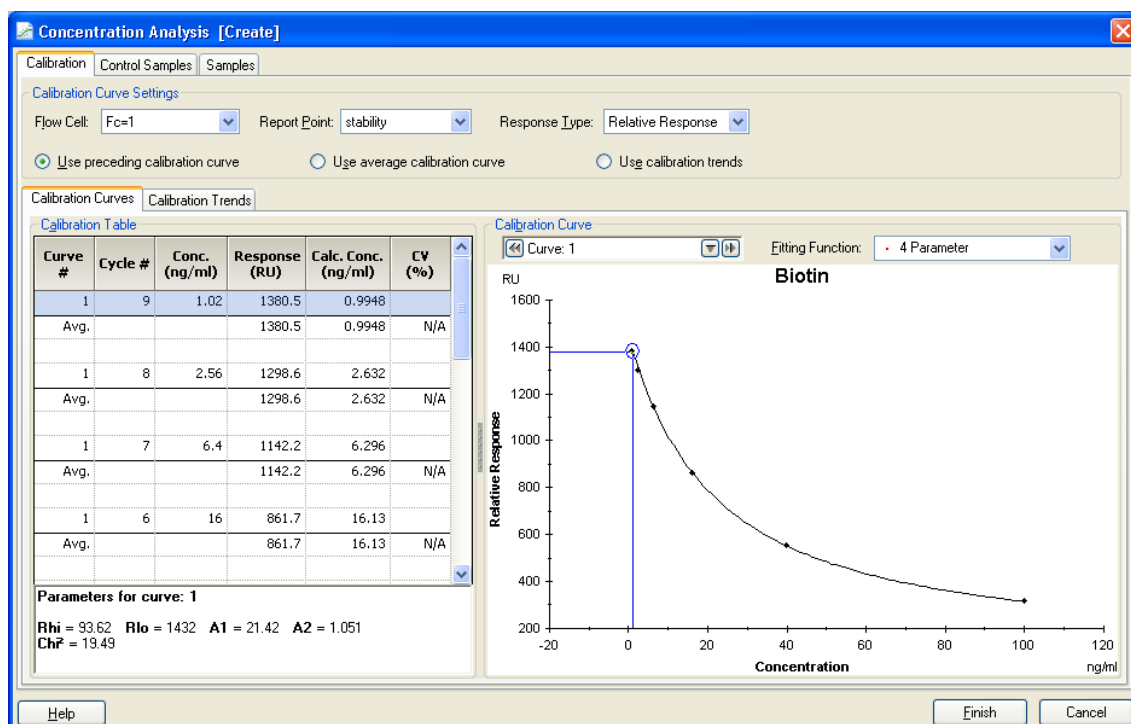
4-1-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、自動保存された取得データが開きます。

補足 4-5. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。

リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。

補足 4-6. 画面の説明

Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Concentration Analysis ▾ をクリックします。

Using calibration をクリックします。

↓

Concentration Analysis［Create］ボックスの Calibration が表示されます。

<u>Calibration Curve Settings</u>

Flow cell	解析に使用するセルの選択
Report point	レポートポイントの選択
Response type	結合レスポンス（Relative Response）で濃度測定するか、傾き（Slope）で濃度測定するか選択します。
Fitting Function	検量線を linear で引くか、4-parameter で引くか選択します。

Use preceding calibration curve

サンプル測定の直前で測定した検量線を利用する場合にチェックを入れます。

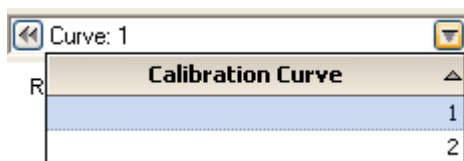
Use average calibration Curve

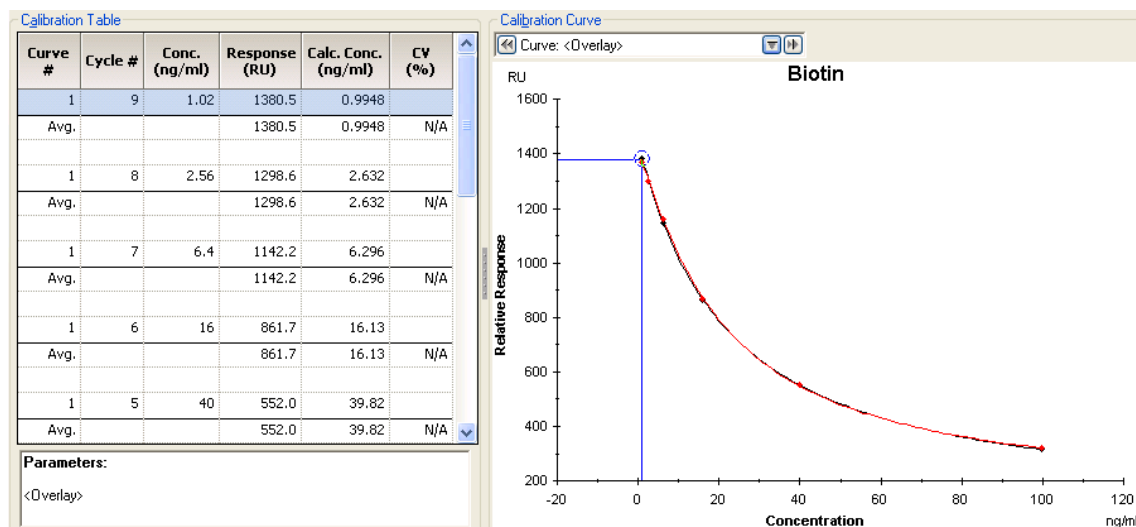
検量線を複数作成していて平均した検量線を利用する

場合にチェックを入れます。

Use calibration trends	検量線を複数作成している場合で、時間経過に伴う結合量の低下を考慮したサイクル毎の検量線を利用する場合にチェックを入れます。（サイクル毎の検量線はバーチャル作成されます。）

設定した条件の検量線を確認します。

Calibration Curve Curve: 1 のもしくはをクリックし、目的のサイクルを選択します。複数の検量線を同時に確認する場合は、を使用します。

キーボードの Ctrl キーを押しながら、カラム中の目的の番号をクリックします。連続した番号を選択する場合は、マウスをドラッグして選択可能です。

Curve #	Cycle #	Conc. (ng/ml)	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)
1	9	1.02	1380.5	0.9948	
Avg.			1380.5	0.9948	N/A
1	8	2.56	1298.6	2.632	
Avg.			1298.6	2.632	N/A
1	7	6.4	1142.2	6.296	
Avg.			1142.2	6.296	N/A
1	6	16	861.7	16.13	
Avg.			861.7	16.13	N/A
1	5	40	552.0	39.82	
Avg.			552.0	39.82	N/A

画面右に設定した検量線が表示されます。**Use calibration trends** を選択した場合には、全検量線の重ね書きが表示されます。

画面左の **Calibration Table** に検量線の各測定ポイントの詳細情報が表示されます。Conc.にはメソッドで入力した濃度、Calc.Conc.には作成した検量線から計算した濃度が表示されます。同一濃度で繰り返し測定している場合には、算出された濃度の CV 値が CV（%）に表示されます。

検量線の測定ポイントの選択削除、検量線の選択削除は、補足 4-7 および 4-8 を参照してください。

未知サンプルの測定結果

Concentration Analysis［Create］ボックス上部の Samples のタブの付いたページをクリックします。

Cycle #	Sample Id	Dil. Fact.	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)	Calib. Curve
12	501-2436-01	1	1001.1	10.54		1
13	501-2436-01	1	987.4	11.02		1
14	501-2436-01	2	1173.7	10.97		1
15	501-2436-01	2	1168.6	11.23		1
Avg.				10.94	2.640	
16	501-2436-02	1	606.8	33.64		1
19	501-2436-02	1	607.1	33.62		1
Avg.				33.63	0.04622	
20	501-2437-01	1	808.5	18.8		1
21	501-2437-01	1	813.3	18.54		1
Avg.				18.67	0.9643	
22	501-2438-01	1	737.5	23.01		1
23	501-2438-01	1	729.3	23.55		1
Avg.				23.28	1.637	
26	501-2439-01	1	812.8	18.57		1
27	501-2439-01	1	822.6	18.05		1
Avg.				18.31	1.986	

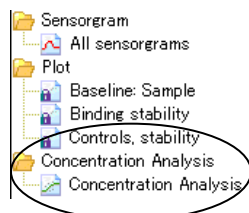
画面左の **Sample Table** にサンプル情報が表示されます。Dil.Fact.（希釈倍率）を掛けた濃度が Calc.Conc.に表示されます。同一サンプルで繰り返し測定している場合には、算出された濃度の CV 値が CV（%）に表示されます。

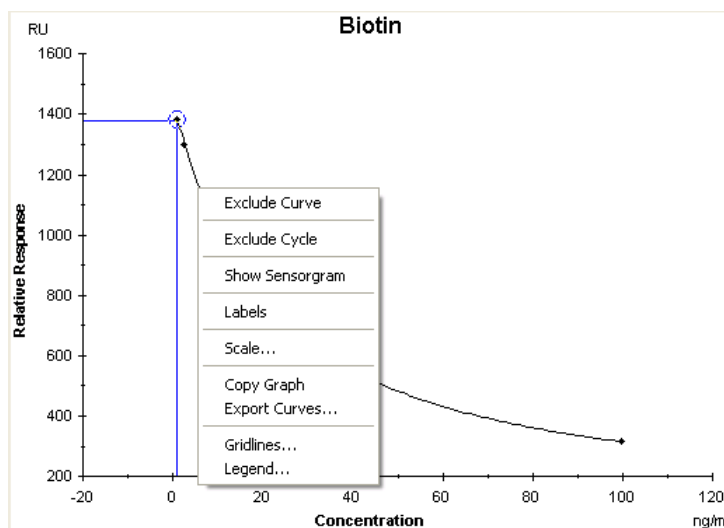
クリックして選択したサンプルについては、画面右で強調表示されます。

測定ポイントの選択削除は、補足 4-7 を参照してください。

Finish をクリックします。

↓

解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに保存されます。

補足 4-7. 測定ポイントの削除

エアーの混入などの理由で、測定結果から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックします。

Exclude Cycle をクリックします。

↓

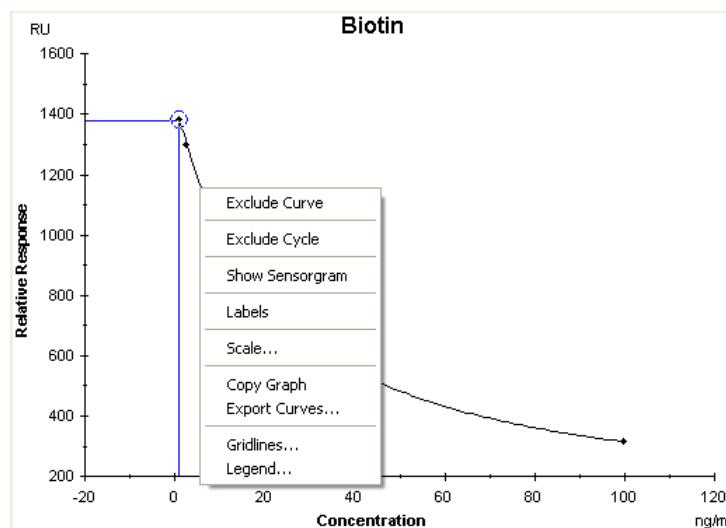
測定ポイントが削除され、同時に Calibration Table の削除した測定ポイントに赤色の削除ラインが引かれます。

Curve #	Cycle #	Conc. (ng/ml)	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)
1	9	1.02	1380.5	1.017	
Avg.			1380.5	1.017	N/A
1	8	2.56	1298.6	2.565	
Avg.			1298.6	2.565	N/A
~~1~~	~~7~~	~~6.4~~	~~1142.2~~		
Avg.					
1	6	16	861.7	15.99	
Avg.			861.7	15.99	N/A
1	5	40	552.0	40.02	
Avg.			552.0	40.02	N/A

検量線の測定ポイントを削除した場合には、改めて残りの測定ポイントで検量線が作り直されます。

再度採用する場合には、マウスを右クリックして、**Include Cycle** を選択します。

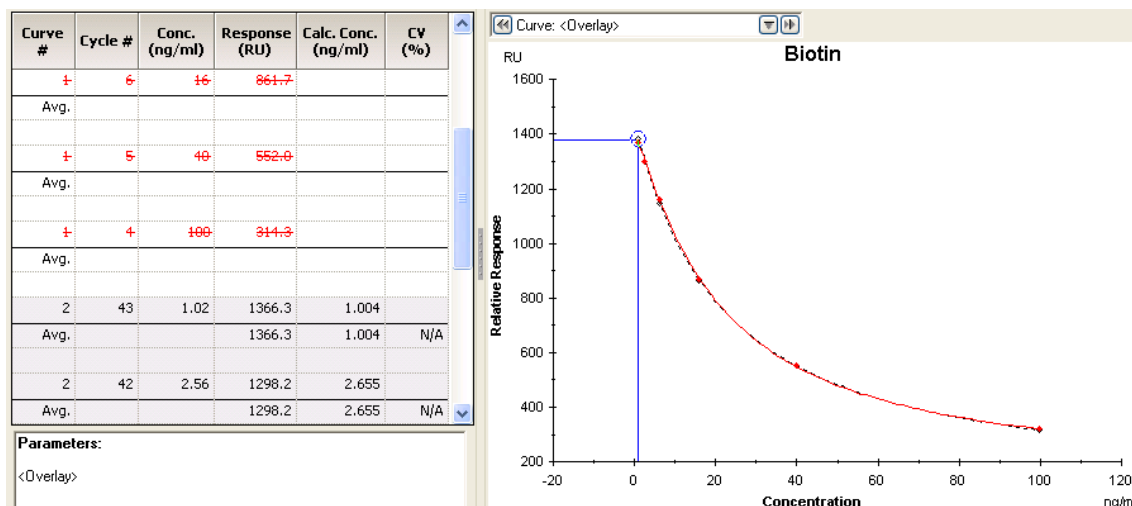
補足 4-8. 検量線の削除

エアーの添加などの理由で、複数回数取得している検量線のうち、解析から削除したい検量線がある場合、いずれかの測定ポイント上でマウスを右クリックします。

Exclude Curve をクリックします。

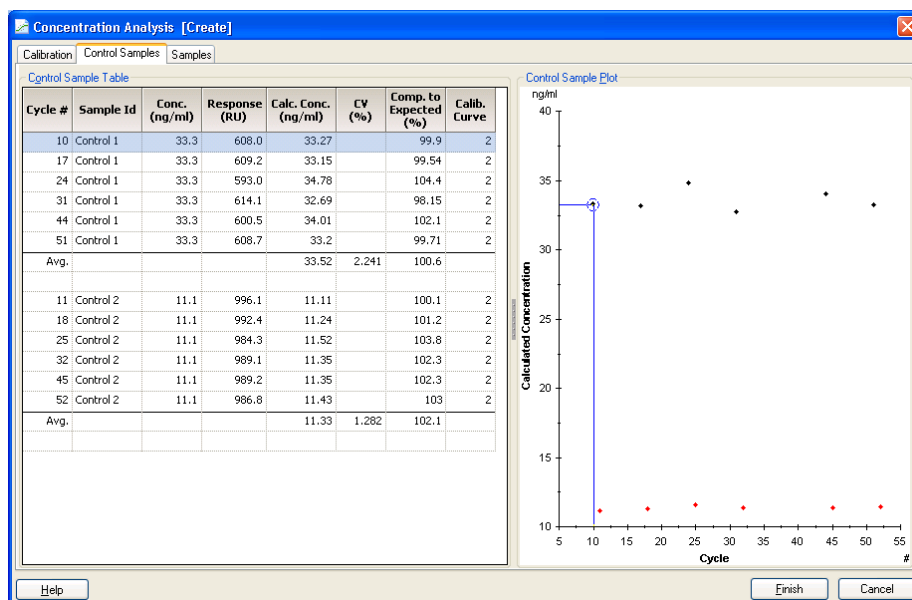
↓

検量線は削除され、同時に Calibration Table のその検量線を構成している全測定ポイントに赤色の削除ラインが引かれます。

Curve #	Cycle #	Conc. (ng/ml)	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)
~~1~~	~~6~~	~~16~~	~~861.7~~		
Avg.					
~~1~~	~~5~~	~~40~~	~~552.0~~		
Avg.					
~~1~~	~~4~~	~~100~~	~~314.3~~		
Avg.					
2	43	1.02	1366.3	1.004	
Avg.			1366.3	1.004	N/A
2	42	2.56	1298.2	2.655	
Avg.			1298.2	2.655	N/A

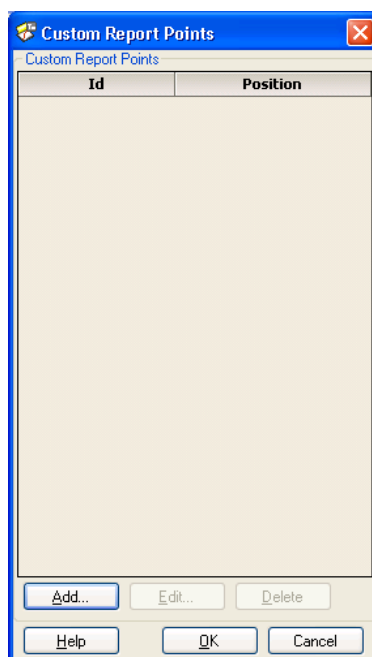
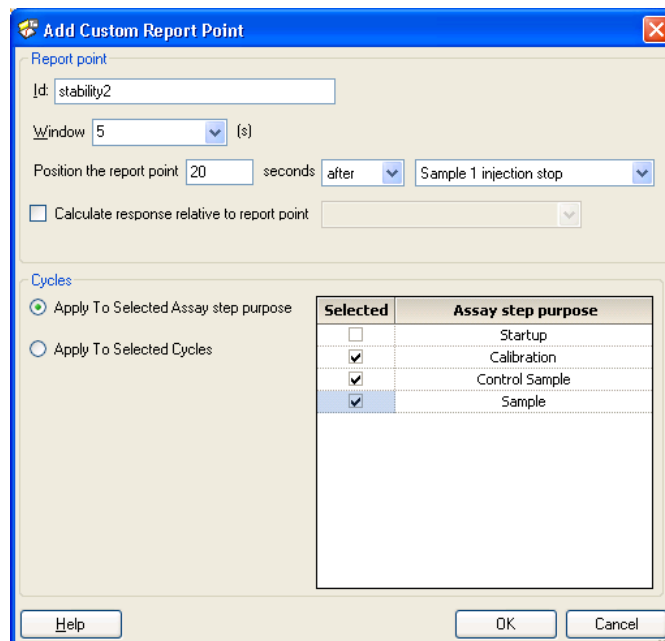
Parameters:
<Overlay>

再度採用する場合には、マウスを右クリックして、**Include Curve** を選択します。

補足 4-9. コントロールサンプルのレスポンスのチェック

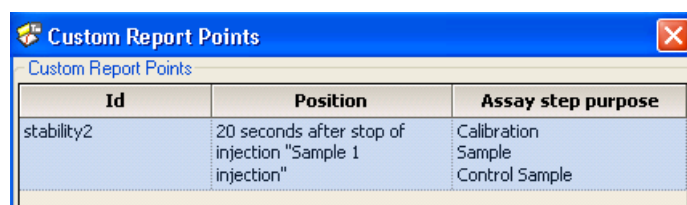
定期的にコントロールサンプルを添加している場合、その結合レスポンスを Concentration Analysis ［Create］ボックス上部の Control Samples のタブの付いたページでチェックすることができます。

補足 4-10. レポートポイントの追加

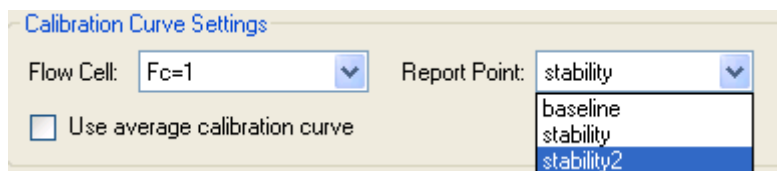
Tools→Custom Report Points をクリックします。

Add をクリックします。

↓

Id にレポートポイントの名前を入力します。追加する位置を設定し、Cycles でどのサイクルで記録するのか設定します。

OK をクリックします。

↓

初期画面に、追加したレポートポイントが表示されます。

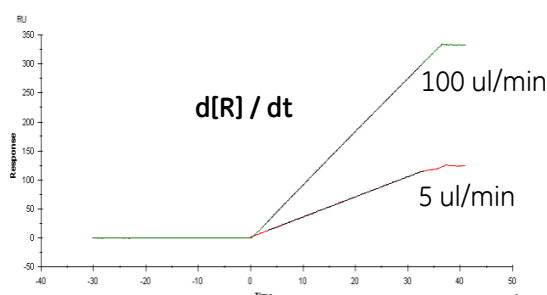
なお、追加したレポートポイントは、Calibration Settings の Report Point に追加されます。

4-2. 検量線不要の濃度測定

CFCA （Calibration Free Concentration Analysis）

検量線を必要としない濃度測定法（CFCA ; Calibration Free Concentration Analysis） は、アナライトの拡散特性とセンサーグラムの結合領域初期における結合速度（初期結合速度）を利用して、カーブフィッティングにより、結合活性を有するアナライト分子の絶対濃度を算出する方法です。適した標準分子がない場合や、標準サンプルの結合活性濃度を確認したい場合に有効です。さらに、厳密な速度定数と親和定数を求める目的においても、CFCA により絶対的な結合活性濃度を求めることは有効です。

$$\frac{d[R]}{dt} = f\left(M_w, k_m, Conc\right)$$

M_W ：分子量（Da）

k_m ：マストランスポート係数

CFCA では、リガンドをできるだけ多く固定化（例：分子量 150 kDa で 5000 RU 以上）し、マストランスポートリミテーション条件下で測定を実施します。固定化量が多い表面において、初期結合速度は、アナライトの分子量（Mw）、マストランスポート係数（k_m）、アナライト濃度（Conc）で決定されます。このため、上記の初期結合速度（d[R] / dt）の関数を利用してサンプル中のアナライト濃度を算出することができます。

測定は、アナライトを最低 2 流速（5 および 100 µl/min を推奨）で添加して、センサーグラムから初期結合速度を求めます。マストランスポート係数（k_m）は、拡散係数（D）、流速、フローセル容積から計算できます。得られた 2 流速でのセンサーグラムを、1:1 結合モデルで Kinetics 解析し、アナライトの分子量（Mw）、k_m 値を定数とし、アナライト濃度をパラメータとしてカーブフィッティングすることで濃度を算出します。なお、アナライトが抗体（Bivalent Analyte）であっても、マストランスポートリミテーション条件下で、カーブフィッティングが良好であれば、CFCA を実施することができます。

参考文献：

Christensen, Anal. Biochemistry （1997）249, p.153

Sigmundsson, K., *et. Al.*, Biochemistry （2002） 41, p.8263

CFCA を実施するための至適条件

① アナライト	分子量　≧ 5,000Da
② 結合速度定数（k_a）	10^7 ＞ k_a ＞ 5 X 10^4 $M^{-1}s^{-1}$
③ 固定化量	できるだけ多く固定化します。 （分子量 150 kDa では、5,000 RU 以上は必要。）
④ アナライト濃度	CFCA で良好な結果が得られる濃度レンジは、0.5～50 nM です。測定に用いるサンプル濃度は、1 μg/ml 程度が至適です。吸光度（280 nm）による総タンパク質濃度を基準として調製します。濃度が不明な場合には、10 倍希釈系列で 4 濃度以上調製してください。
⑤ 流速	5 μl/min および 100 μl/min を推奨します。
⑥ サンプルの性状	拡散係数や分子量が大きく異なる分子の混合溶液の場合には CFCA は実施できません。 例）アナライトが IgG のポリクローナル抗体の場合には CFCA は可能ですが、アナライトが IgG と IgM の混合溶液の場合には CFCA は実施できません。
⑦ リファレンスセル	リファレンスセルも設定し、リファレンスセルを差し引いたセンサーグラムを利用して CFCA を実施します。
⑧ 非特異的吸着	非特異的吸着が起きている場合に正確な濃度が算出できません。

補足 4-11. マストランスポート、マストランスポートリミテーションとは

マストランスポートとは、フローセルを流れる溶液中からセンサーチップ表面への、アナライトの拡散現象を表します。アナライトのセンサーチップ表面への拡散（供給）速度は、次式で求められます。

アナライトの拡散速度（mol/m^2s）＝アナライト濃度 × マストランスポート係数（km）

$$k_m = 0.98 \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times f}{0.3 \times h^2 \times w \times l}}$$

D　：拡散係数　　f　：測定流速　　h：フローセルの高さ
w　：フローセルの幅　　l　：フローセルの長さ

なお、アナライトの拡散速度よりも、センサーチップ表面のリガンドとの結合速度が速い場合、マストランスポートが結合速度を制限するため、マストランスポートリミテーションが起きているといえます。リガンドの固定化量が多い場合には、マストランスポートリミテーションが起きやすいです。

補足 4-12. 拡散係数の求め方

CFCA を実施する場合、20℃における拡散係数がパラメータとして必要です。
拡散係数は、分子のサイズと形状によって決定され、次式によって算出できます。

$$D = \frac{324.3 \times 10^{-11}}{f \times \eta_{rel} \times M_w^{1/3}} \quad (m^2/s)$$

f　：摩擦率
η_{rel}　：20℃での水に対するアナライト溶媒の粘性
Mw　：分子量（Da）

なお、以下の方法でも拡散係数を得ることができます。
① Biacore ウェブの Biacore T200 の拡散係数算出ツール
② 文献値
③ 実験的に算出（超遠心分析や光散乱分析など）

Biacore ウェブの Biacore T200 の拡散係数算出ツールによる拡散係数の求め方

次のアドレスにアクセスします。
http://www.biacore.com /diffusion_calculator
↓

◄ BACK　PRINT

Diffusion Coefficient Calculator / Converter

This on-line tool is designed to help you calculate diffusion coefficients for use in Calibration-Free Concentration Analysis assays. It is accessible only via a valid product key associated with the appropriate types of Biacore software.

To access this section, you need to be logged in and have a valid 'Product Key' registered in your account details. If you do not have a Biacore website account yet, you can signup here.

User ID:
Password:
FORGOT PASSWORD ?　LOGIN

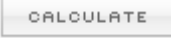
ユーザー名（User ID）とパスワード（Password）を入力して、LOGIN をクリックします。（事前に、ユーザー登録が必要です。）
↓

画面上で、20℃における拡散係数を算出します。

① Molecular weight:　　分子量（Da）を入力します。

② Friction ratio:　　摩擦率。

〇Choose molecular shape にチェックを入れ、

の▼をクリックして該当の値を選択します。以下の、3 項目から選択できます。

- Globular　(1.2)・・・球形のタンパク質（初期設定値）
  例）抗体など
- Moderately elongated　(1.7)・・・長いタンパク質
  例）フィブロネクチンやプラスミノーゲンなど
- Elongated　(2.5)・・・硬く、長いタンパク質
  例）フィブリノーゲンやトロポミオシンなど

○ Enter value にチェックを入れると、任意の値を入力できます。

③ Viscosity relative to water at 20℃

20℃における水に対するアナライト溶媒の粘性。○ Use standard value （1.00）にチェックを入れると、粘性係数を 1 とします。（初期設定値）

○ Enter value にチェックを入れると、任意の値を入力できます。

①～③の設定が終了したら、CALCULATE をクリックし計算を実行します。④に計算結果が表示されます。

Convert diffusion coefficient from temperature T to 20°C

Temperature T: 25 (°C)

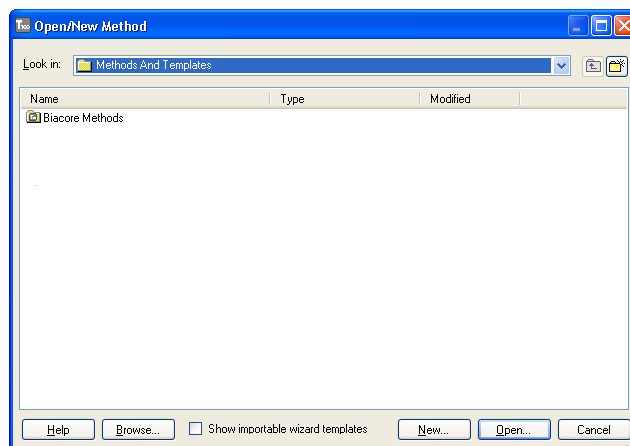
D at temperature T: 4.00e-11 (m^2/s)

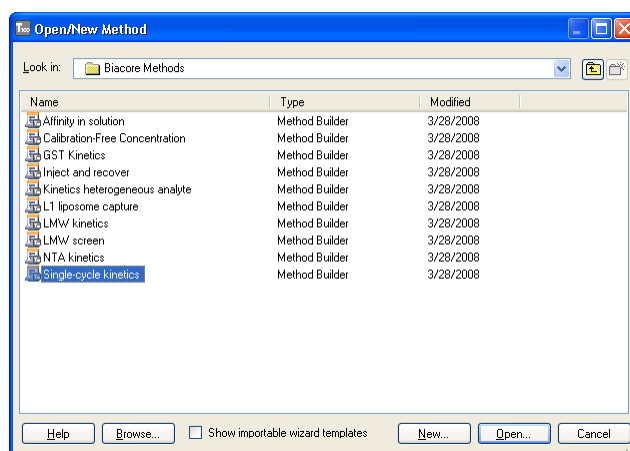
CONVERT　Diffusion coefficient at 20°C = 3.49e-11 (m^2/s)

画面下では、任意の温度における拡散係数から、20℃における拡散係数を算出することができます。文献や実測によって、20℃以外での拡散係数が得られている場合にも利用できます。

4-2-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Method アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method** をクリックします。

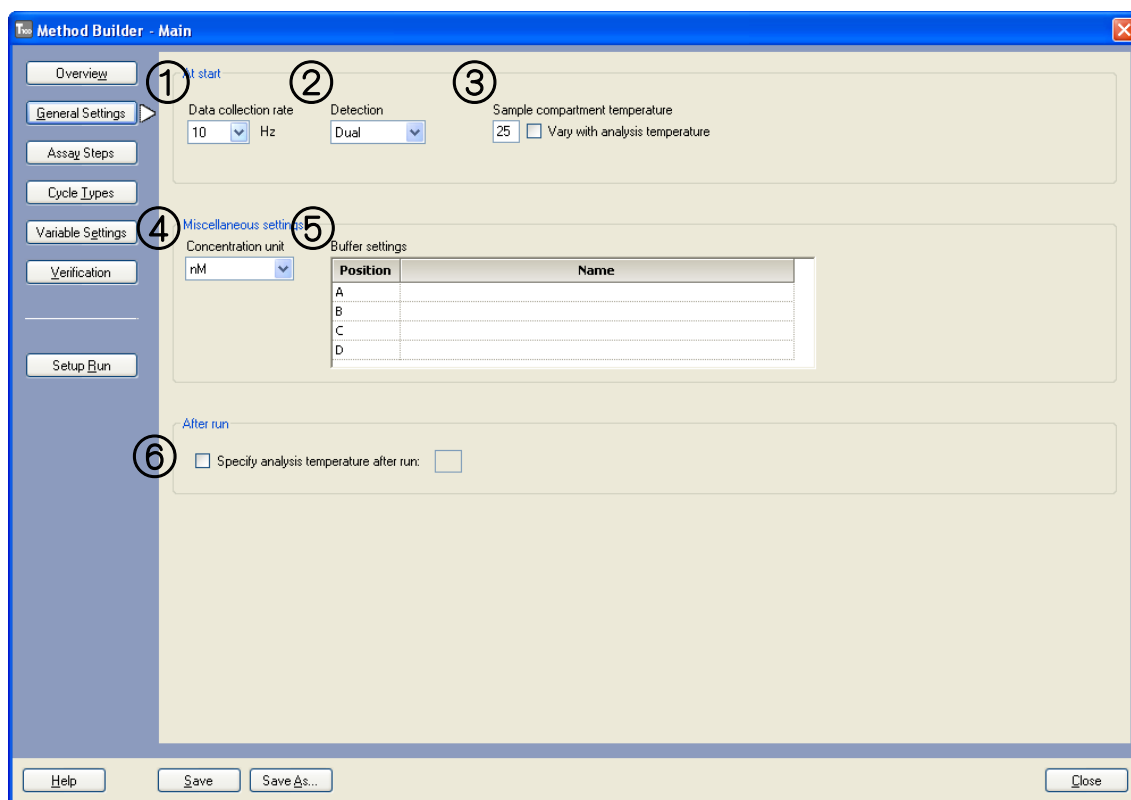
↓

Biacore Methods を選択した後、**Open** をクリックします。

↓

Calibration-Free Concentration を選択した後、**Open** をクリックします。

↓

Method Builder の Main ダイアログが表示されます。Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は BiacoreT200 日本語取扱説明書　基本操作編を参照してください。

↓

General Settings をクリックします。

① Data Collection rate

10Hz を選択します。

② Detection

検出モードを以下の 2 つ（Dual,Multi）から選択します。

Dual　2-1、4-3

Multi　2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ Sample compartment temperature

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定します。通常は、25℃。

④ Concentration unit

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択します。

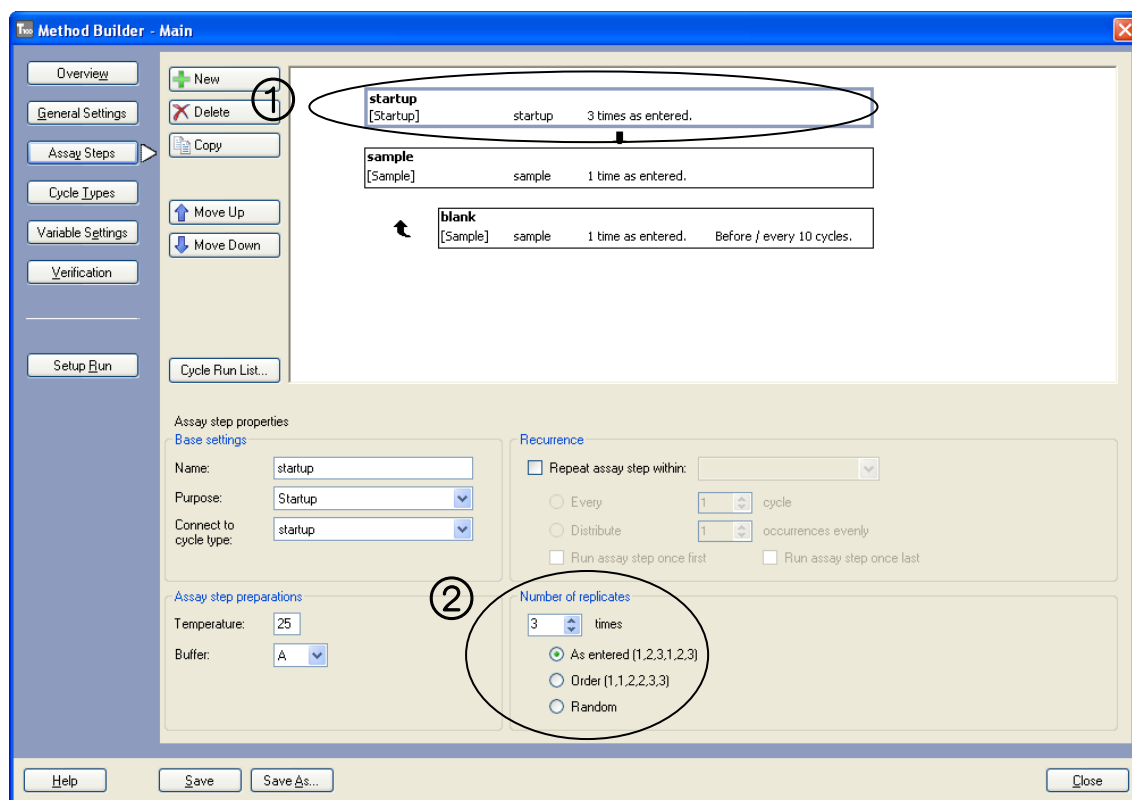
⑤ Buffer settings

使用するランニング緩衝液名を入力します。

⑥ After run

チェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更されます。

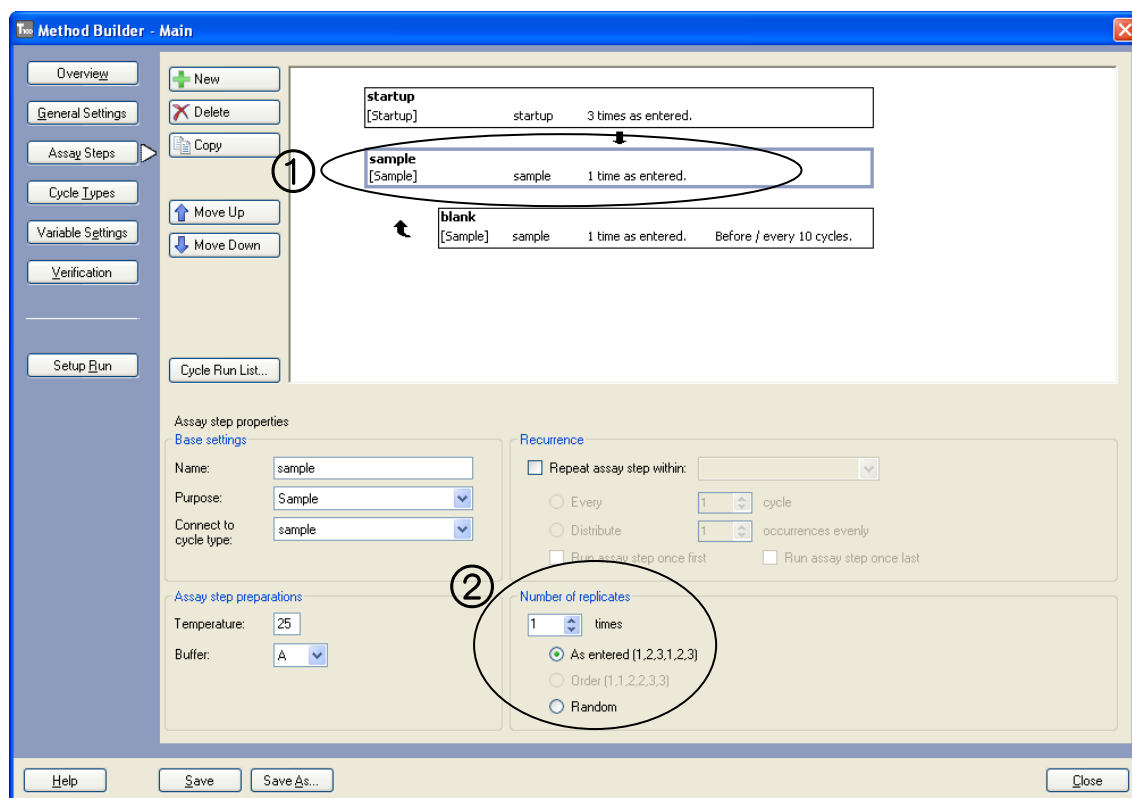
設定後、**Assay Steps** をクリックします。

↓

① Startup を選択します。

② 下記のように設定します。

Number of replicates

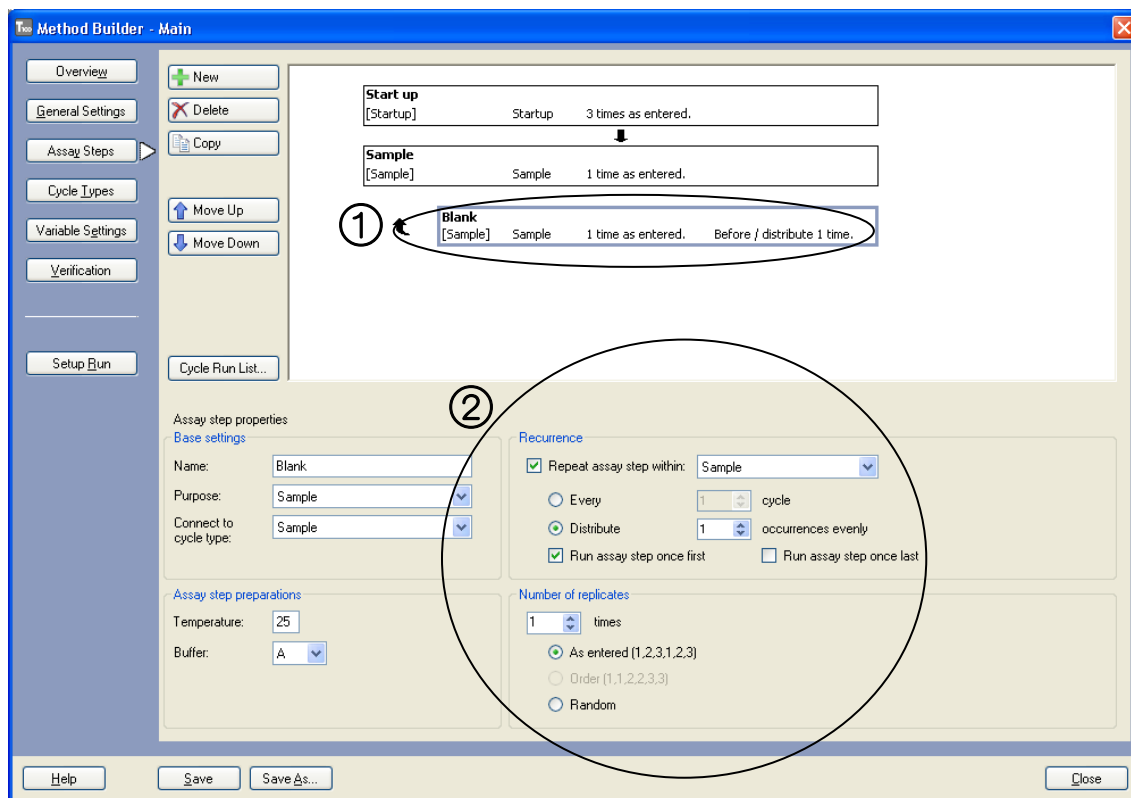
times	ベースライン安定化のためのスタートアップの測定回数を指定します。3 回以上を推奨します。

↓

① Sample を選択します。

② 下記のように設定します。

Number of replicates

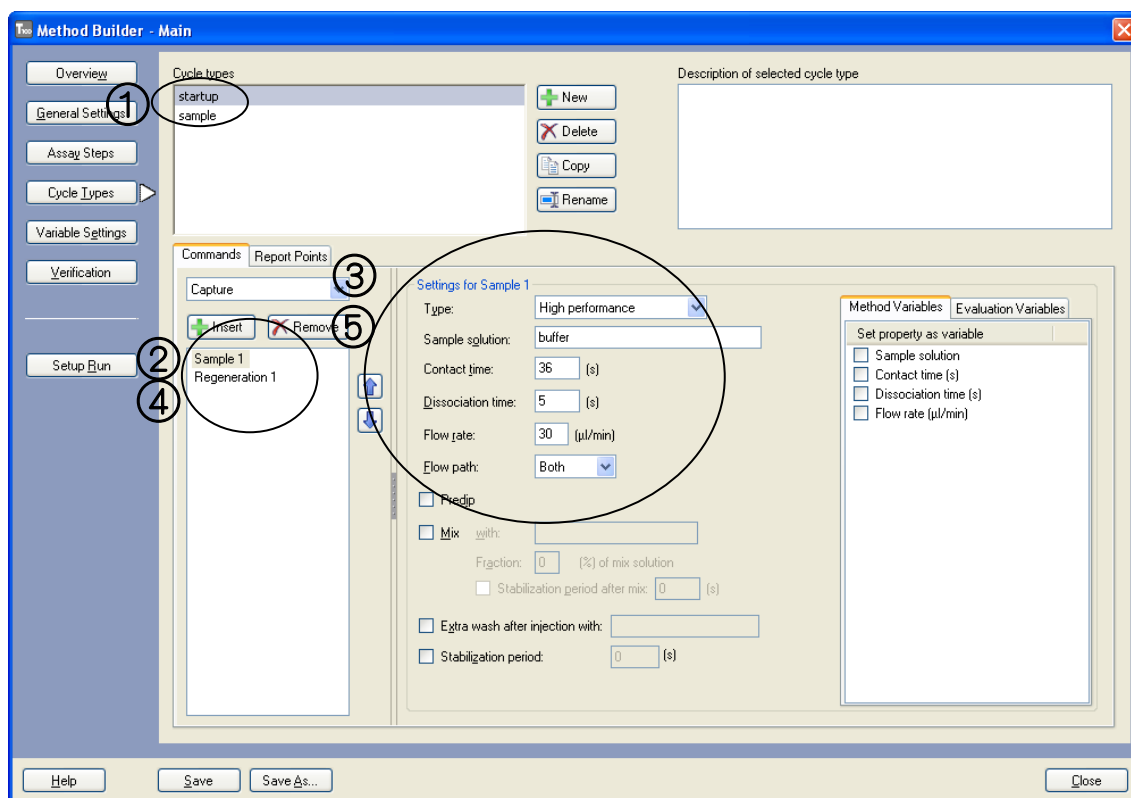
times　　　　繰り返し測定回数を選択します。

↓

① blank を選択します。

② 下記のように設定します。

Recurrence	○Distribute にチェックを入れ、occurrences evenly で 1 を選択。 全測定サイクル内で、均等にブランクの測定を実施します。
Number of replicates	
times	繰り返し測定回数を選択します。

↓

Cycle Types をクリックします。

① Startup をクリックします。アナライト測定前のスタートアップの詳細を設定します。

② Commands タブの Sample1 をクリックします。

③ Settings for Sample1 でスタートアップ用サンプル（Buffer）添加の詳細条件を設定します。測定流速以外は、サンプル添加と同一条件を設定します。

Type　High performance を選択します。

contact time　添加時間（s)。基本は 36 秒です。

Dissociation time　解離時間（s)。基本は 5 秒です。

Flow rate　流速（µl/min)。基本は 30 µl/min です。

Flow path　Both を選択します。

Sample solution　Buffer　（ランニング緩衝液）

④ 引き続き、Commands タブの Regeneration1 をクリックします。

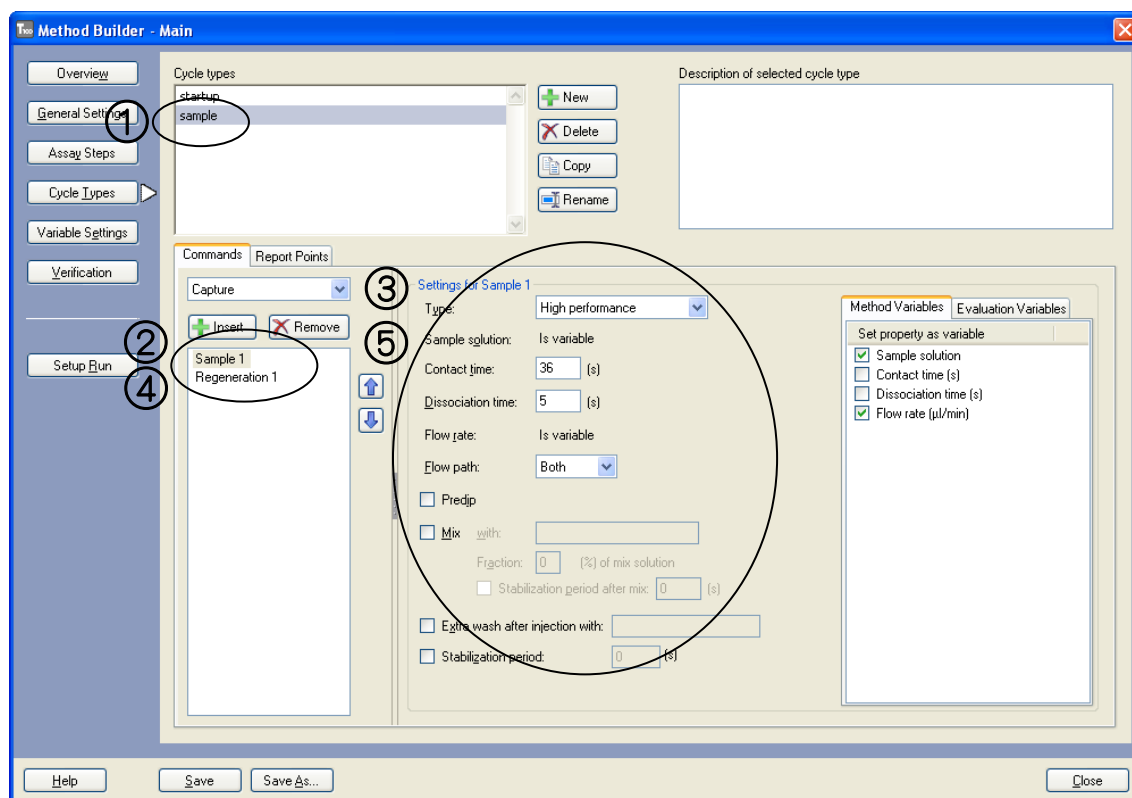
⑤ 再生条件を設定します。

Regeneration solution　再生溶液名を入力します。

contact time　添加時間（s)

Flow rate　流速（µl/min)

Flow path　Both を選択します。

↓

① Cycle types currently in Method の Sample をクリックします。

② Commands タブの Sample1 をクリックします。

③ Settings for Sample1 でサンプル添加の詳細条件を設定します。

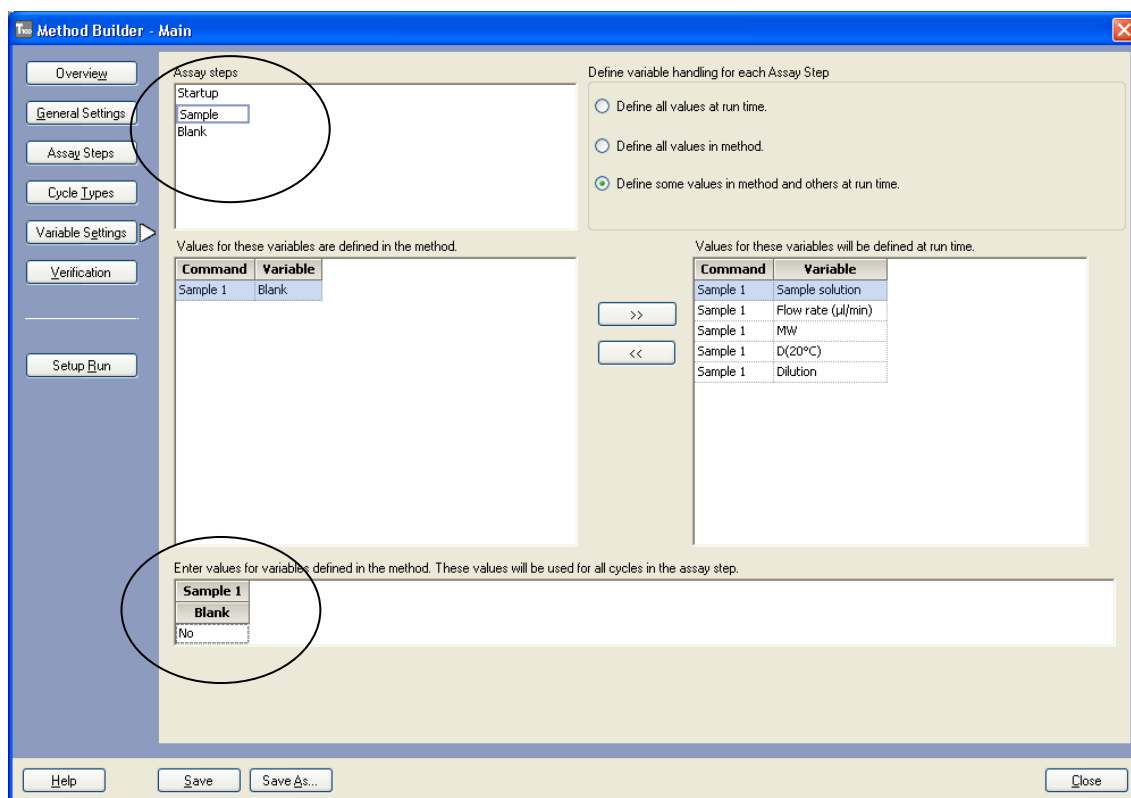
Type	High performance を選択します。
contact time	添加時間（s）。基本は 36 秒です。
Dissociation time	解離時間（s）。基本は 5 秒です。
Flow rate	Is variable に設定されています。実数は、Setup Run の Variables で入力します。
Flow path	Both を選択します。

④ 引き続き、Commands タブの Regeneration1 をクリックします。

⑤ 再生条件を設定します。

Regeneration solution	再生溶液名を入力します。
contact time	添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	Both を選択します。

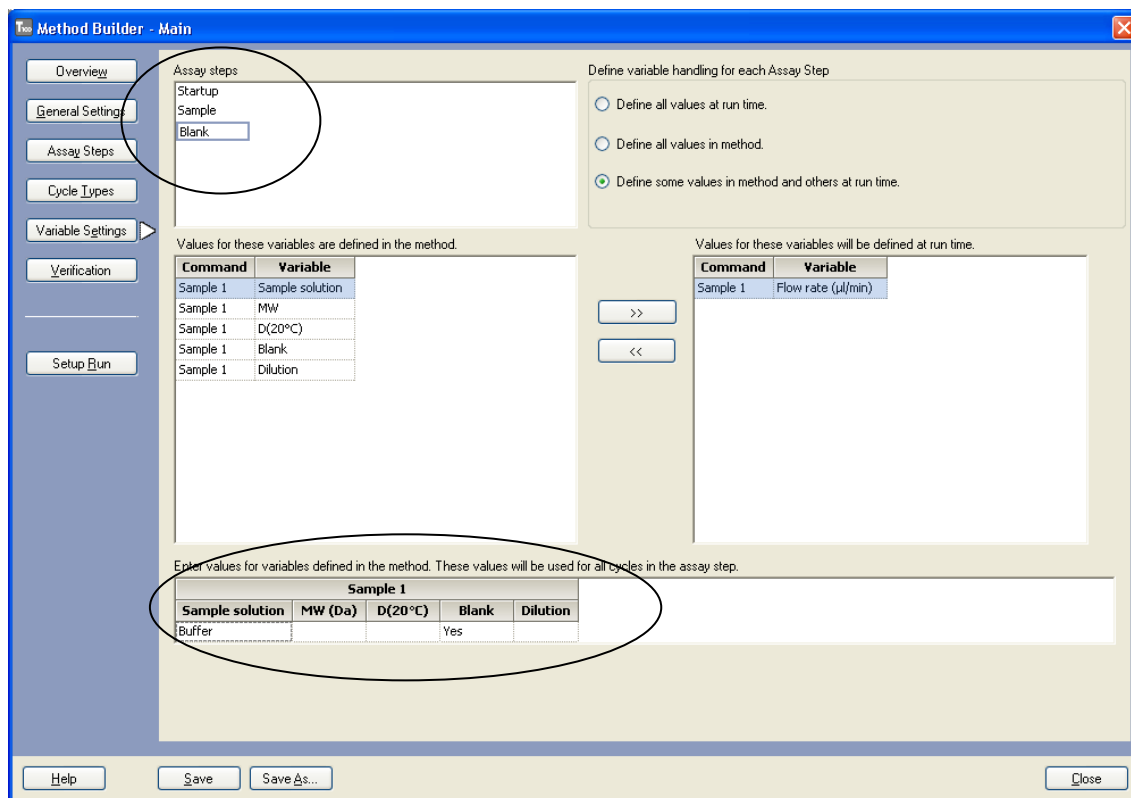
↓

Variable Settings を選択します。

Assay Steps の Sample をクリックします。画面右上で、○ Define some values in Method and others at run time. にチェックを入れます。下記の 5 項目については、Setup Run 以降の Variables で入力します。

Sample solution	サンプル名
Flow rate　(µl/min)	同一サンプルで、5 µl/min と 100 µl/min の 2 流速を設定します。
MW（Da）	分子量
D（20℃）	20℃における拡散係数
Dilution	サンプルの希釈倍率

以下について、画面下で設定します。

Blank	解析時のキーワードとして利用します。ブランクサンプルか否かを指定します。サンプルの場合には、"No"または"n"を入力します。

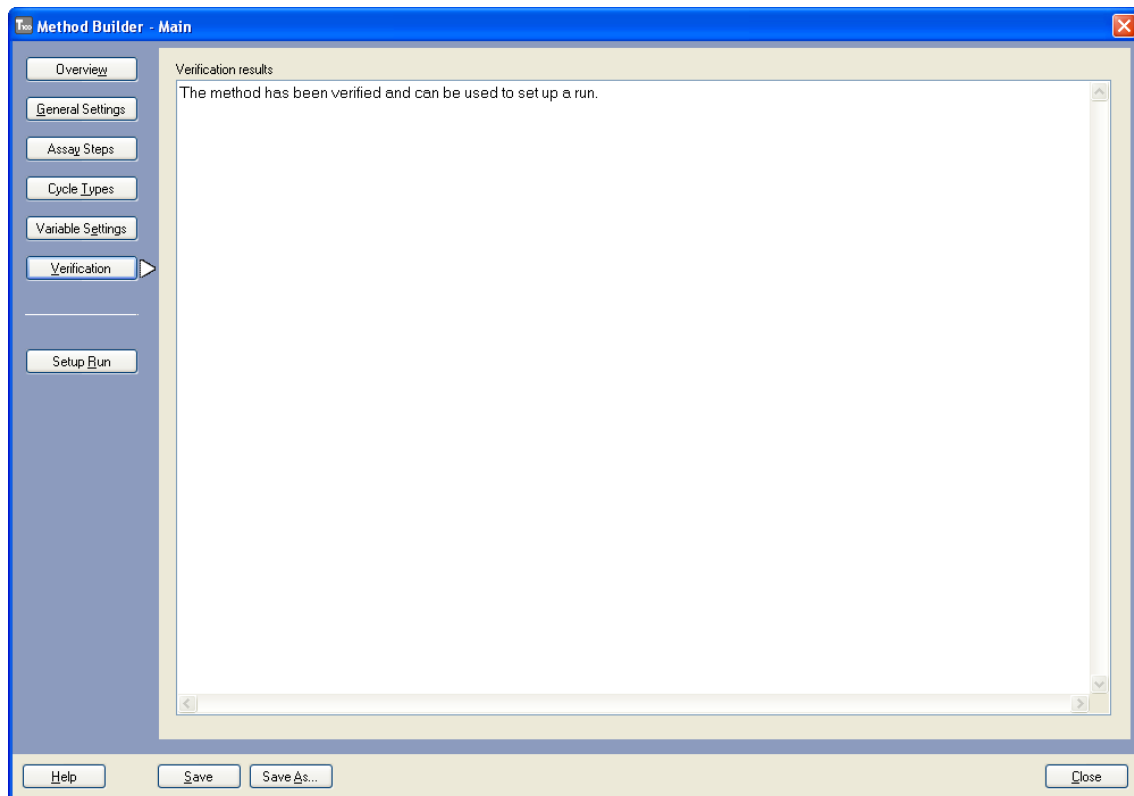
↓

Assay Steps の Blank をクリックします。画面右上で、〇 Define some values in Method and others at run time. にチェックを入れます。Flow rate （µl/min）については、Setup Run 以降で入力します。

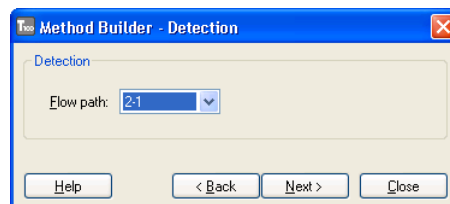
画面下で、下記の項目について入力します。

Sample solution	"Buffer"と入力します。
MW（Da）	未入力
D（20℃）	未入力
Blank	ブランクサンプルの場合には、"Yes"または"y"を入力します。
Dilution	未入力

↓

Verification をクリックします。

↓

メソッドの設定に不備が無ければ“The Method has been verified and can be used to set up a run.”と表示されます。問題が有る場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正します。確認後、**Setup Run** をクリックします。

↓

適切な Flow path を選択し、**Next** をクリックします。

↓

	Sample 1				
	Sample solution	Flow rate (µl/min)	MW (Da)	D(20°C)	Dilution
1	mouse IgG (x1/6400)	5	150000	5.09E-11	6400
2	mouse IgG (x1/6400)	100	150000	5.09E-11	6400
3	mouse IgG (x1/1600)	5	150000	5.09E-11	1600
4	mouse IgG (x1/1600)	100	150000	5.09E-11	1600
5	mouse IgG (x1/400)	5	150000	5.09E-11	400
6	mouse IgG (x1/400)	100	150000	5.09E-11	400
7	mouse IgG (x1/100)	5	150000	5.09E-11	100
8	mouse IgG (x1/100)	100	150000	5.09E-11	100
*					

Sample をクリックします。下記項目について入力します。

Sample solution	サンプル名
Flow rate　(µl/min)	同一サンプルで、5 µl/min と 100 µl/min の 2 流速を設定します
Mw（Da）	分子量
D（20℃）	20℃における拡散係数
Dilution	サンプルの希釈倍率

↓

引き続き、Blank をクリックします。

Flow rate　(μl/min)　　　Sample と同一の流速を設定します

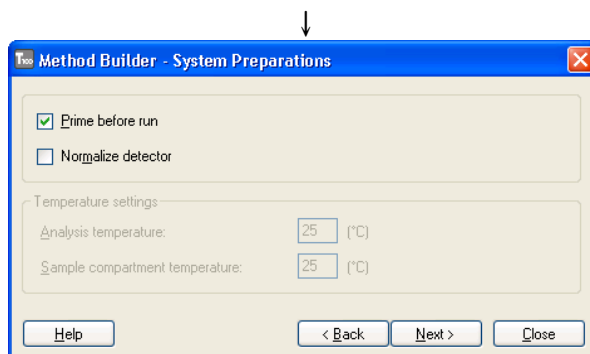
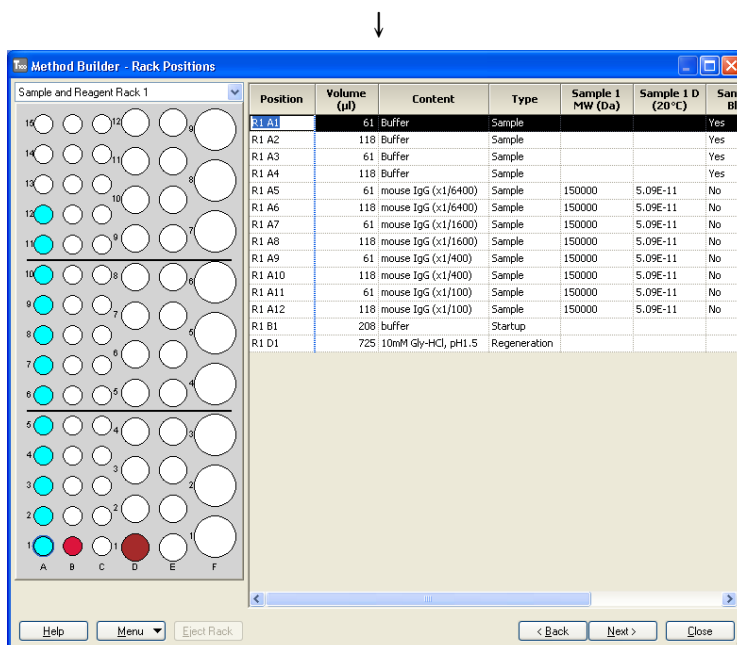
設定後、**Next** をクリックします。

↓

測定サイクルリストが表示されます。

Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Flow rate (μl/min)	Sample 1 MW (Da)	Sample 1 D(20°
1	Start up	buffer			
2	Start up	buffer			
3	Start up	buffer			
4	Blank	Buffer	5		
5	Blank	Buffer	100		
6	Sample	mouse IgG (x1/6400)	5	150000	5.09E-11
7	Sample	mouse IgG (x1/6400)	100	150000	5.09E-11
8	Sample	mouse IgG (x1/1600)	5	150000	5.09E-11
9	Sample	mouse IgG (x1/1600)	100	150000	5.09E-11
10	Blank	Buffer	5		
11	Blank	Buffer	100		
12	Sample	mouse IgG (x1/400)	5	150000	5.09E-11
13	Sample	mouse IgG (x1/400)	100	150000	5.09E-11
14	Sample	mouse IgG (x1/100)	5	150000	5.09E-11
15	Sample	mouse IgG (x1/100)	100	150000	5.09E-11

Next をクリックします。

↓

測定を始める前に、Prime および Normalize をおこなう場合にはチェックを入れます。
入力後、**Next** をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（μl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 4-13. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import...でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

補足 4-14. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。

Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓

ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の **Next** をクリックします。

↓

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

↓

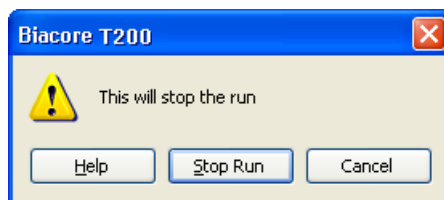
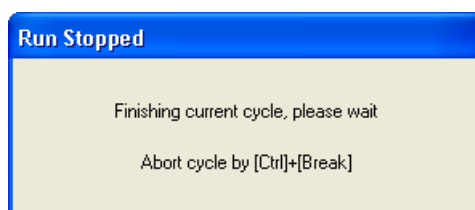
↓

終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 4-15. プログラムの緊急停止

Run→Stop Run をクリックします。

ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

4-2-2. データ解析

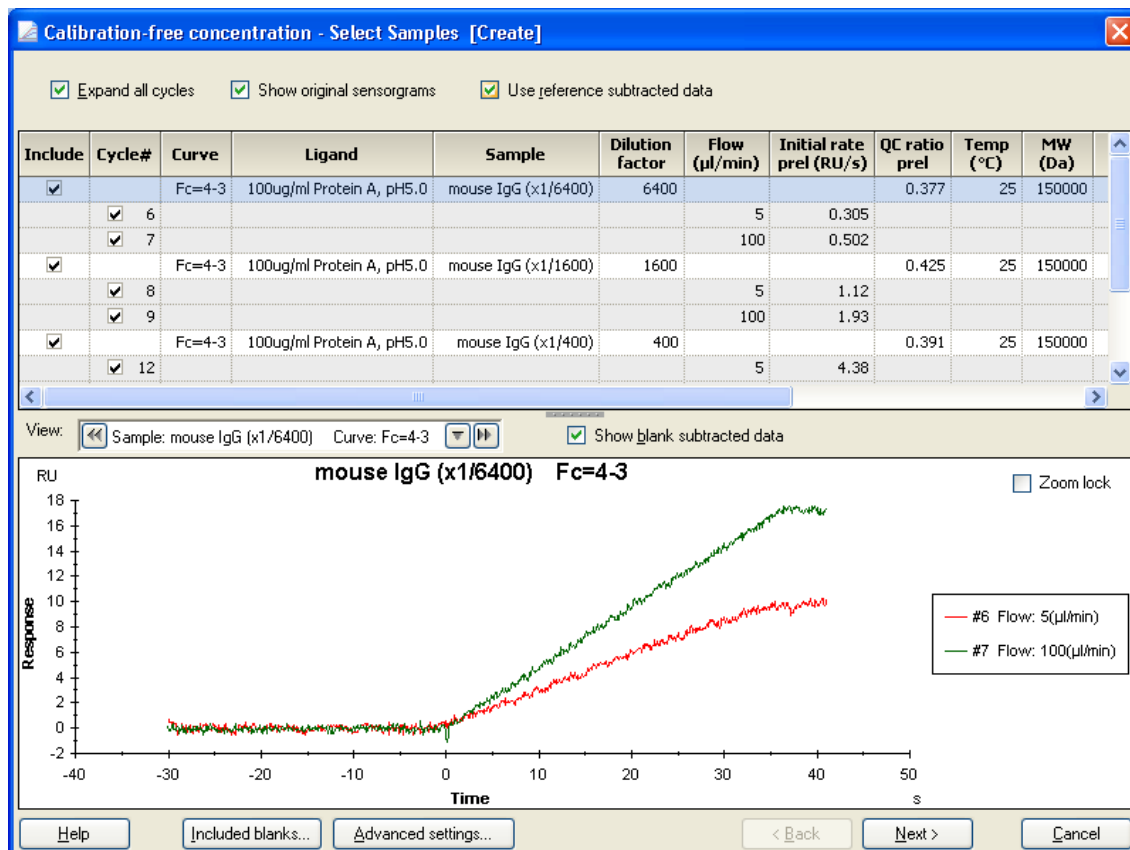
ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

> **補足 4-16. サンプル情報の変更**
>
> サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。
>
> リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。
>
>

補足 4-17. 画面の説明

Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Concentration Analysis をクリックし、Calibration-free をクリックします。

↓

画面上の表に、測定したサンプル情報が、測定サイクル順に表示されます。

Cycle#　　測定サイクル番号

Curve　　カーブタイプ

Ligand　　リガンド名

Sample　　アナライト名

Dilution factor　　希釈倍率

Flow　(μl/min)　　測定流速

Initial rate　(RU/s)　　添加開始後 7.5～12.5 秒の 5 秒幅の結合速度(自動計算されます)

QC ratio　　QC 比（自動計算されます）

Temp　(℃)　　測定温度

MW　(Da)　　分子量

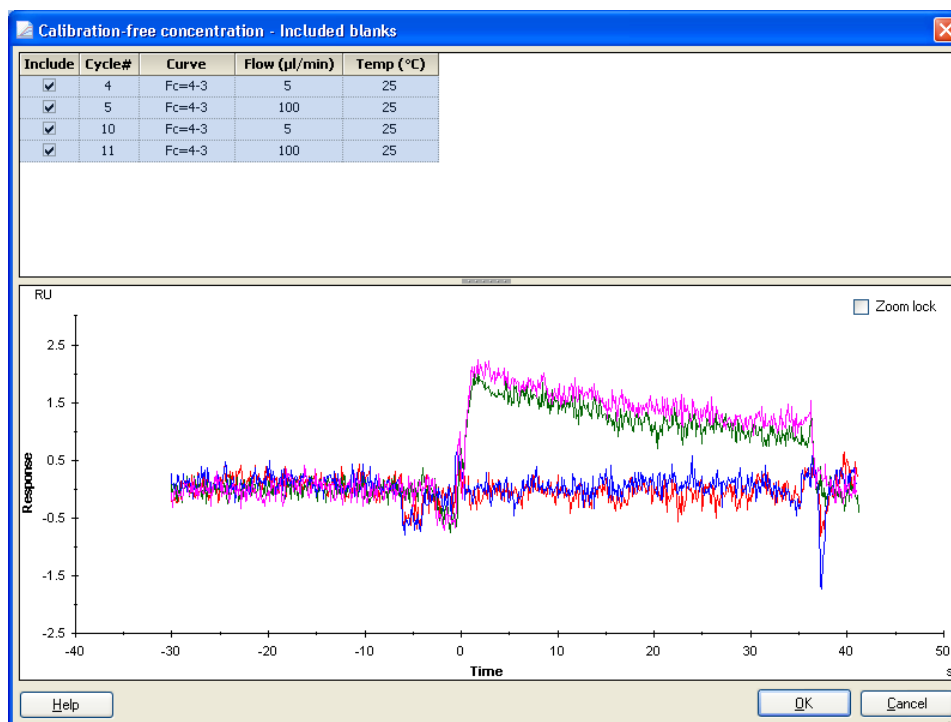
D　(m^2/s)　　測定温度における拡散係数（自動計算されます）

Blank used　　ブランクとして利用しているセンサーグラムのサイクル番号

なお、画面上部の Expand all cycles のチェックを外すと、サンプル情報表の表示がサンプル名別のリストに変更します。 リファレンスセルを差し引かないセンサーグラムで解析する場合には、Use reference subtraction data のチェックを外します。

↓

画面左下の、Included blanks... をクリックして、ブランクを確認します。

Include	Cycle#	Curve	Flow (μl/min)	Temp (°C)
☑	4	Fc=4-3	5	25
☑	5	Fc=4-3	100	25
☑	10	Fc=4-3	5	25
☑	11	Fc=4-3	100	25

センサーグラムを確認して、エアーの混入や形状がおかしいブランクは、画面上表の **Include** のチェックを外します。ブランクセルは差し引かなくても解析は可能です。ブランクを利用しない場合には、**Include** のすべてのチェックを外します。
選択後、**OK** をクリックします。

↓

解析に利用できるセンサーグラムを選択します。

補足 4-18. CFCA に利用するセンサーグラムの選択基準

CFCA では、マストランスポートリミテーション条件下のセンサーグラムを解析に利用します。以下の評価基準を満たすセンサーグラムを解析に利用します。

① 低流速の初期速度（Initial rate　（ RU / s ）　）= 0.2～15　（ RU / s ）

　< 0.2 RU / s では、レスポンスの上昇量が低いため良好な結果が得られません。

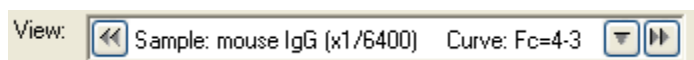
　> 15 RU / s では、マストランスポートリミテーションが十分ではない可能性があります。

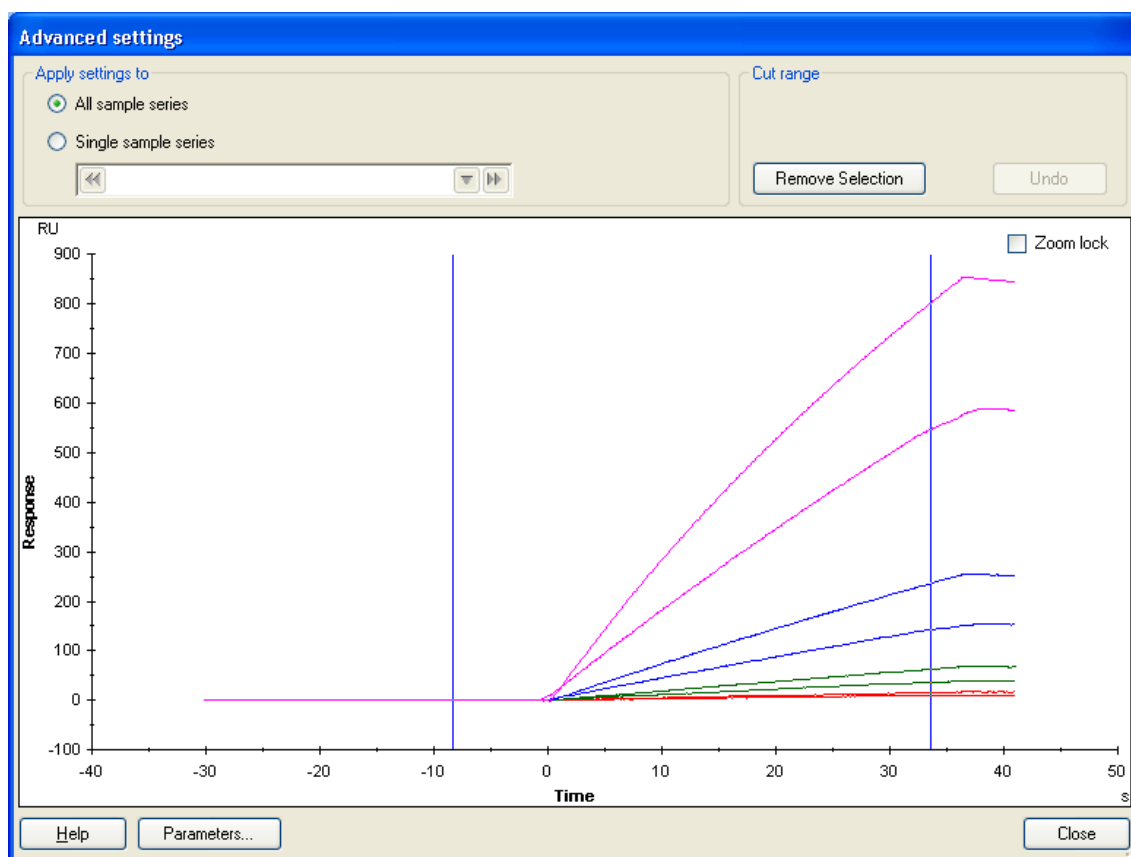
② QC ratio　≧　0.2

　< 0.2 の場合には、マストランスポートリミテーションが十分ではありません。

Include	Cycle#	Curve	Ligand	Sample	Dilution factor	Flow (µl/min)	Initial rate prel (RU/s)	QC ratio prel	Temp (°C)	MW (Da)
	☑ 8					5	1.12			
	☑ 9					100	1.93			
☑		Fc=4-3	100ug/ml Protein A, pH5.0	mouse IgG (x1/400)	1			0.391	25	150000
	☑ 12					5	4.38			
	☑ 13					100	7.31			
☐		Fc=4-3	100ug/ml Protein A, pH5.0	mouse IgG (x1/100)	1			nd	25	150000
	☐ 14					5	17			
	☐ 15					100	26.6			

解析に利用しないセンサーグラムは、**Include** のチェックを外します。

選択したセンサーグラムを確認したい場合には、画面中央の

で選択します。▼をクリックしてセンサーグラムを選択します。Show blank subtracted data のチェックを外すと、リファレンスセルと差し引き前のセンサーグラムを確認できます。
画面右下の **Advanced settings** をクリックします。

↓

選択したセンサーグラムの重ね書きが表示されます。

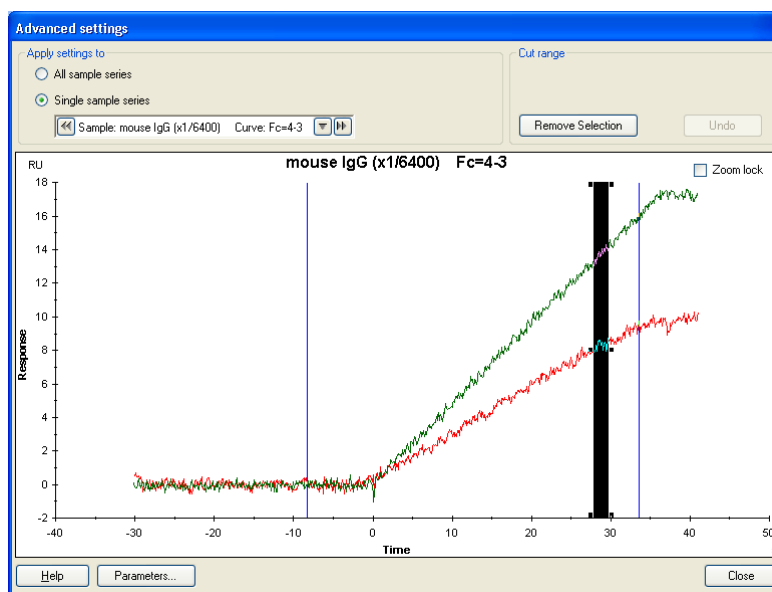
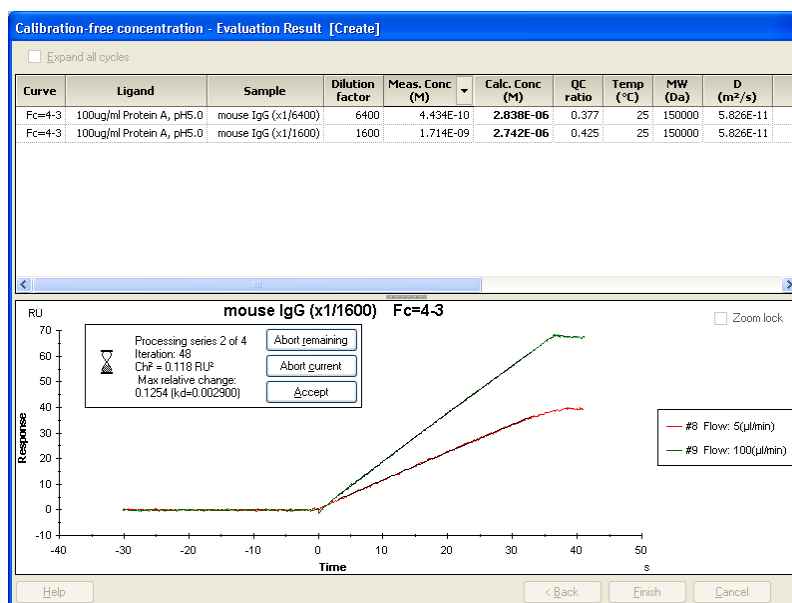
Settings の○**Single Sample series** にチェックを入れ、

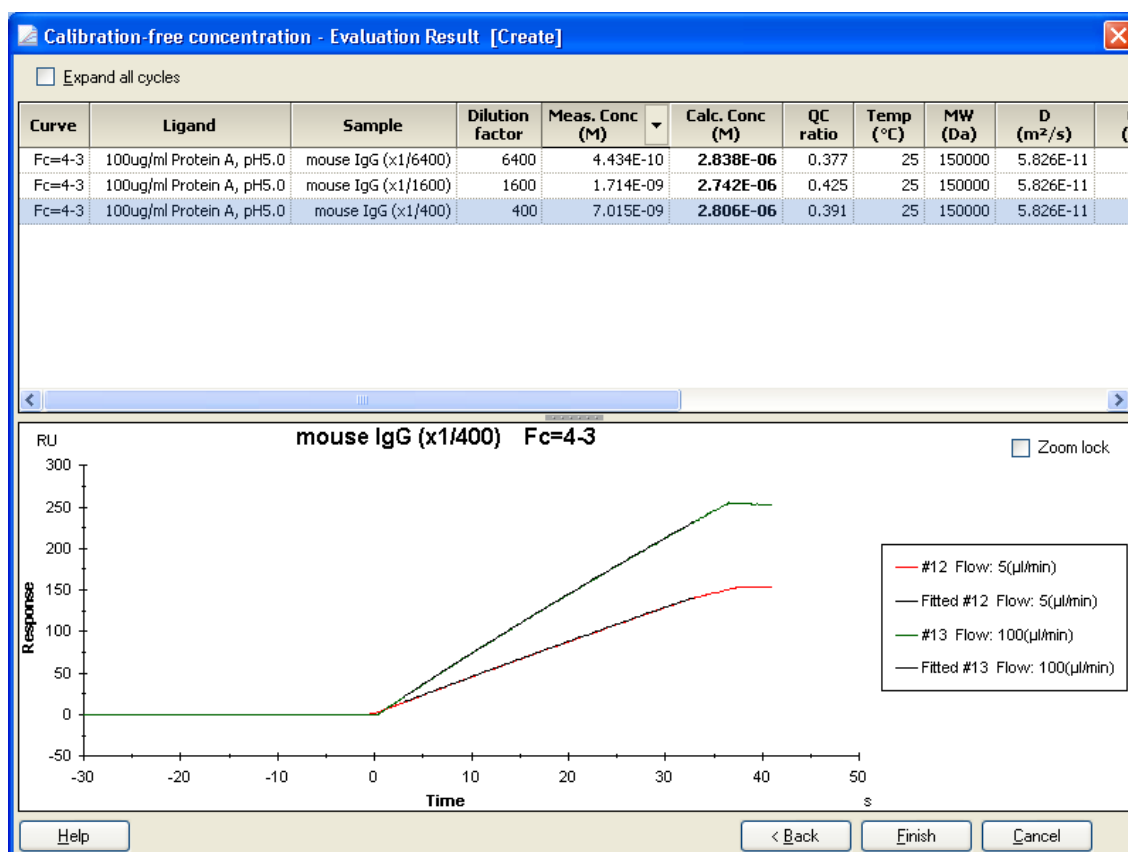
の▼をクリックしてサンプルを選択すると、各サンプルのセンサーグラムの重ね書きに変更できます。
サンプル添加開始 10 秒前から、添加終了 5 秒前の範囲（青いラインで表示）で解析します。
この範囲にエアーの混入などによるノイズが確認できる場合には、該当部位を削除します。（補足 4-19 参照）**Close** をクリックします。

↓

Next をクリックします。

補足 4-19. センサーグラムの部分的削除

エアーの混入などで、センサーグラムが乱れている部分は、以下の方法で削除します。
マウスの左ボタンをドラッグし、該当の領域を拡大した後、マウスの右ボタンをドラッグして削除する領域を選択します。拡大図を解除する場合は、白い部分をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻ります。

領域をクリックすると、グラフ右上の Remove Selection ボタンがアクティブになります。クリックすると、選択部位が削除されます。Undo をクリックすると、削除前に戻ります。

解析が始まります。

↓

解析が終了すると、画面上部に各サンプルの結果が表示されます。

Meas.Conc　（ M ）　　解析によって算出された濃度

▼をクリックすると単位変更が可能です。

Calc.Conc　(M)	希釈倍率を Meas.Conc に掛けた濃度
QC ratio	QC 比
Chi^2　(RU^2)	カイ二乗
SE　(Meas.Conc)	Meas.Conc の標準誤差

解析結果の評価については、補足 4-20 を参照してください。
Finish をクリックします。

↓

上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。

補足 4-20. CFCA の解析結果の評価

以下の基準を満たしている場合には、良好な結果と判断できます。

① カーブフィッティングが良好である
フィッティングが良好な場合、カーブフィッティングによって得られた黒色のセンサーグラムが、測定センサーグラムと一致します。Chi^2 値が、低流速のセンサーグラムの解離直前の結合量の 5%以下であれば、フィッティングが良好と判断できます。

② SE（standard error）が解析結果濃度の 20%以下
SE が算出濃度の 20%以下であれば問題ありません。

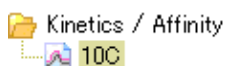
③ 解析結果濃度が、0.5～50 nM の範囲内である
範囲外の場合には、①、②の基準にパスしていても結果の取り扱いに注意が必要です。

補足 4-21. ファイル名の変更

Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックします。

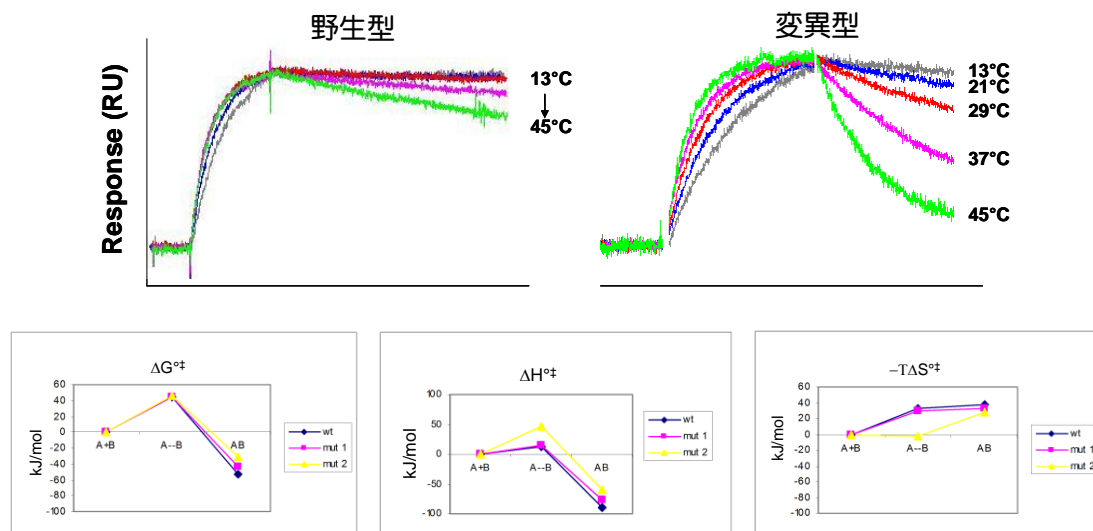
↓

上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力します。

↓

5. 熱力学的パラメータの算出

熱力学的解析

熱力学的パラメータは、分子同士の相互作用メカニズム解析に対して重要な情報を提供します。Biacore では、熱力学的パラメータは、複数の温度条件で速度論的相互作用解析を実施することで算出できます。平衡状態における熱力学的パラメータ（ΔG°、ΔH°、ΔS°）のみならず、遷移状態における熱力学的パラメータ（$\Delta G^{\circ\ddagger}$、$\Delta H^{\circ\ddagger}$、$\Delta S^{\circ\ddagger}$）も算出することが可能です。平衡状態におけるパラメータからは“その分子同士がその強さで結合する理由”、遷移状態におけるパラメータからは“その分子同士がその速度で結合、解離する理由”を議論することができます。

例として、ある抗原と抗体（野生型と 2 種類の変異型）の相互作用を紹介します。
通常の速度論的解析では、ある温度で相互作用測定を実施し、算出された反応速度定数の比較から野生型と変異型の結合および解離速度の違いを知ることができます。さらに、熱力学的解析の結果からは、下図に示したように、変異型 2 の$\Delta H^{\circ\ddagger}$と$\Delta S^{\circ\ddagger}$が野生型および変異型 1 のそれらとは大きく異なっていることがわかります。すなわち、変異型 2 は野生型および変異型 1 とは異なった様式で相互作用していることが示唆されます。

熱力学的パラメータの解析手順

数段階の温度（4 段階以上）において同一分子間のカイネティクス解析を実施し、解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を算出します。
平衡状態、遷移状態における熱力学的パラメータ算出には、それぞれ次式を応用しています。各温度において算出した解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を代入します。

平衡状態における熱力学的パラメータ算出

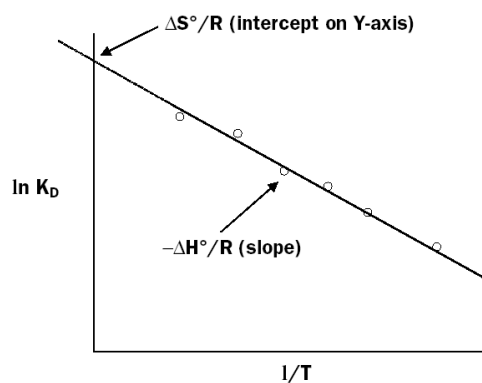
van't Hoff 式を応用します。各温度における解離定数（K_D）を代入し、各種パラメータを算出します。線形解析と非線形解析により算出可能です。

線形解析

$\Delta G^\circ = RT \ln K_D$

$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$

$\ln K_D = \Delta H^\circ / RT - \Delta S^\circ / R$

ΔG°	自由エネルギー変化（kJ/mol）
R	気体定数
T	絶対温度（K）
K_D	解離定数（M）
ΔH°	エンタルピー変化（kJ/mol）
ΔS°	エントロピー変化（J/K・mol）

非線形解析

$$RT\ln K_D = \Delta H^\circ_{T_0} - T\Delta S^\circ_{T_0} + \Delta C^\circ_p(T - T_0) - T\Delta C^\circ_p \ln\left(\frac{T}{T_0}\right)$$

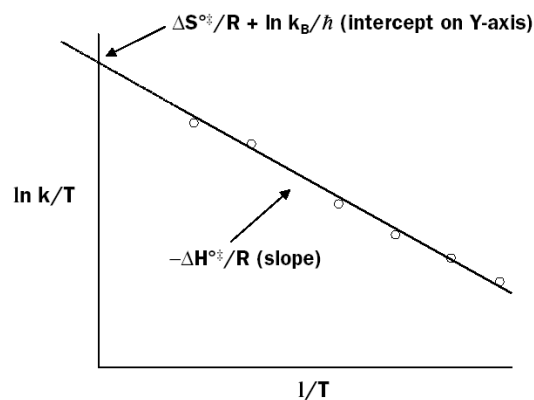
ΔC_p	熱容量変化（kJ/K・mol）
T_0	基準温度（標準状態では 25℃）

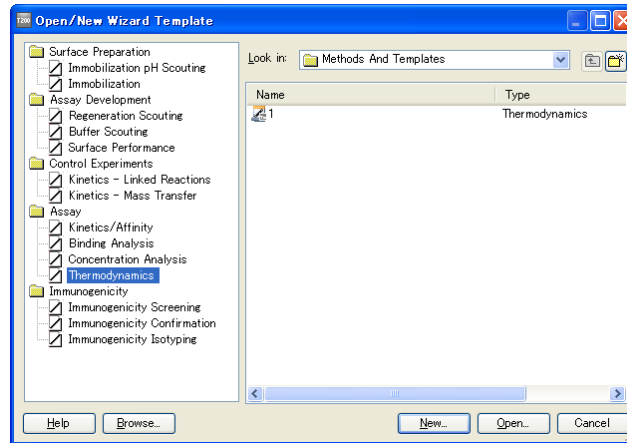
遷移状態における熱力学的パラメータ算出

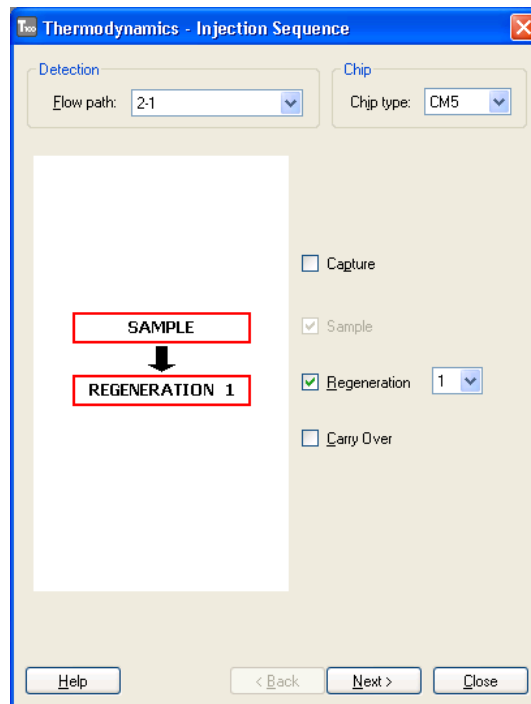
Eyring 式を応用します。各温度における反応速度定数（k_a, k_d）を代入し、各種パラメータを算出します。

$k = (k_B T / h) \exp(\Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT)$

$\ln k / T = \Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT + \ln kB / h$

k	各反応速度定数
k_B	ボルツマン定数
h	プランク定数
$\Delta S^{\circ\ddagger}$	エントロピー変化（J/K・mol）
R	気体定数
$\Delta H^{\circ\ddagger}$	エンタルピー変化（kJ/mol）
T	絶対温度（K）
$\Delta G^{\circ\ddagger}$	自由エネルギー変化（kJ/mol）

5-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の **Run→Wizard** をクリックします。

Assay→Thermodynamics を選択した後、**New** をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open** をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse** をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open** をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　2-1 もしくは 4-3 を設定します。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択します。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされます。

Sample

アナライトの添加コマンドです

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数を選択します。（1 or 2）

Carry Over

アナライトのキャリーオーバーを確認する場合にチェックを入れます

Next をクリックします。

↓

Conditioning

Solution　再生溶液または緩衝液の名称

contact time　添加時間（s）

Number of injections	添加回数

Startup

Solution	指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施します。通常は、ランニング緩衝液を用います。
Number of cycles	サイクル数。3 回以上を推奨します。

Solvent correction

低分子化合物がアナライトで溶媒補正が必要な場合にチェックを入れます。

Number of injections	溶媒補正の測定点を選択します。何サンプルごとに溶媒補正を実施するかを、"Repeat after ▭ Sample cycles"で指定します。

Temperatures

Analysis temperatures	検出部位の温度を設定します。25℃を真ん中に、5 点以上を推奨します。

Sample compartment temperatures

サンプルコンパートメントの温度を入力します。

Next をクリックします。

↓

Sample

contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Dissociation time	解離時間	120 s

Extra wash after injection with

アナライト添加後に指定した溶液で、フローセル以外の流路を洗浄したい場合にチェックを入れます。センサーチップ表面には流れません。

Regeneration

Solution	再生溶液の名称

High viscosity solution	粘性の高い溶液（40%エチレングリコール以上）の場合に選択します
contact time	再生溶液の添加時間　　60 s
Flow rate	流速　　30 μl/min
Stabilization period	添加後のベースライン安定化時間　0 s （必要に応じて設定します）

入力後、**Next** をクリックします。

↓

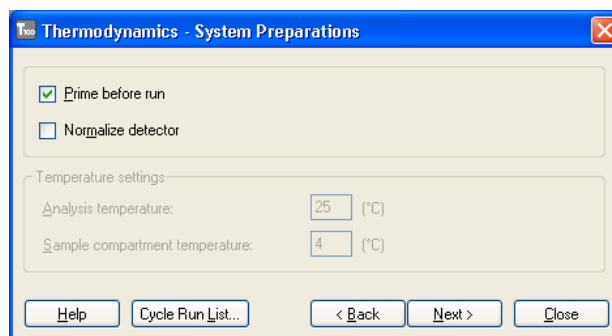
	Sample id	MW (Da)	Concentration nM	Concentration μg/ml
1	antigen	11800	0	0.000
2	antigen	11800	0	0.000
3	antigen	11800	1.06	0.01251
4	antigen	11800	2.13	0.02513
5	antigen	11800	4.25	0.05015
6	antigen	11800	8.5	0.1003
7	antigen	11800	17	0.2006
8	antigen	11800	1.06	0.01251
9				

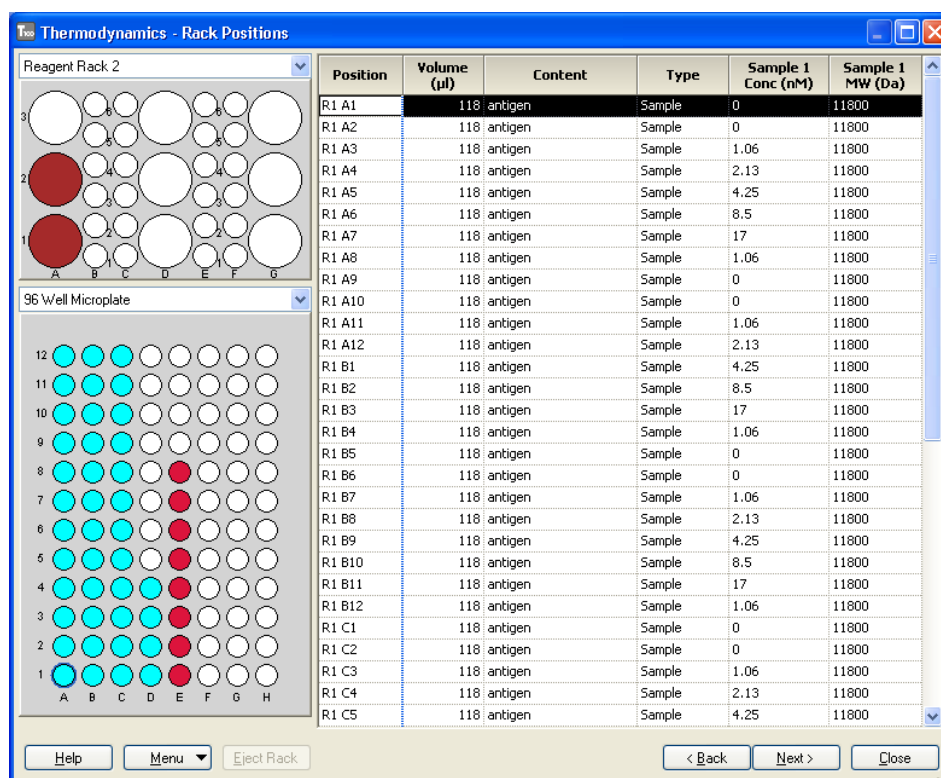
Sample id	アナライトの名称
MW　(Da)	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 μg/ml”を換算します。

入力後、**Next** をクリックします。

↓

補足 5-1. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力します。

測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

↓

右側の表でサンプルの位置と容量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 5-2. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu→Export Positions を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu→Sample Position Import でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

補足 5-3. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。

Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓

ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の **Next** をクリックします。

↓

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。

Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

↓

設定温度に達するまで、上記ウインドウが表示されます。設定温度に達すると測定が開始されます。

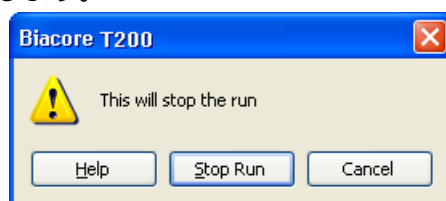
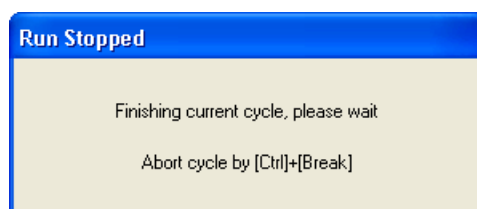
↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動します。

補足 5-4. プログラムの緊急停止

Run→**Stop Run** をクリックします。

ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓

Run Stopped

Finishing current cycle, please wait

Abort cycle by [Ctrl]+[Break]

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

5-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

補足 5-5. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。

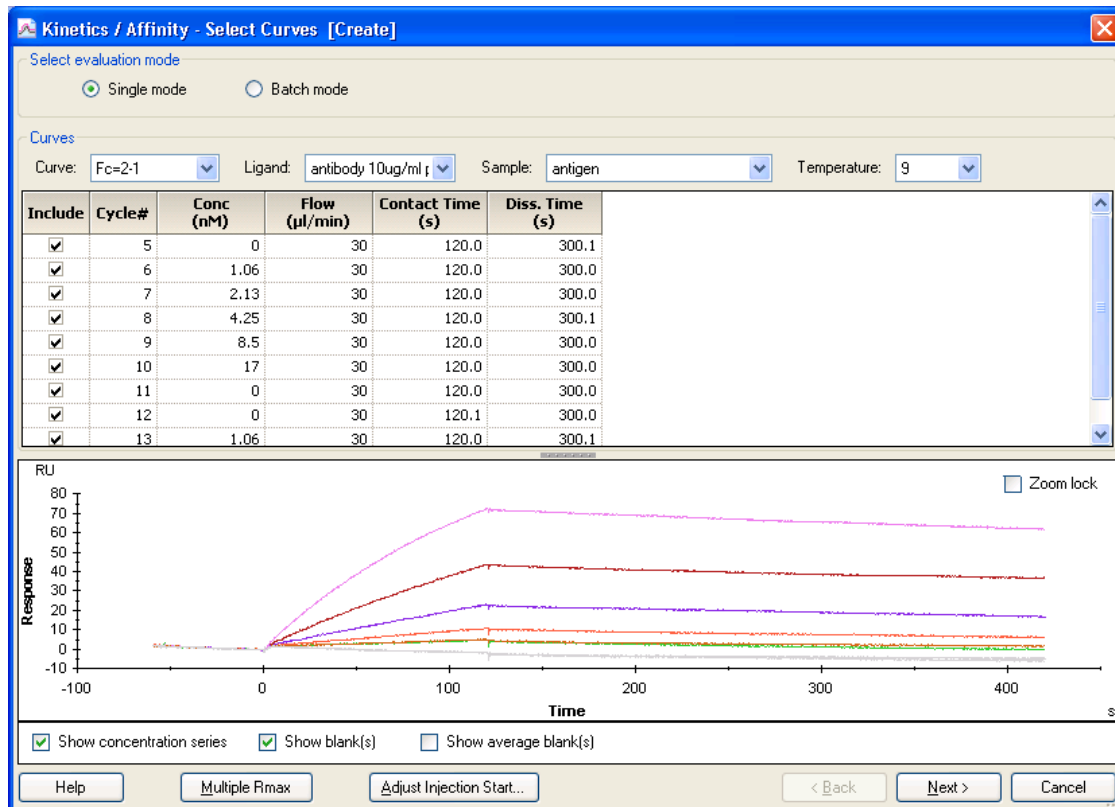
リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。

補足 5-6. 画面の説明

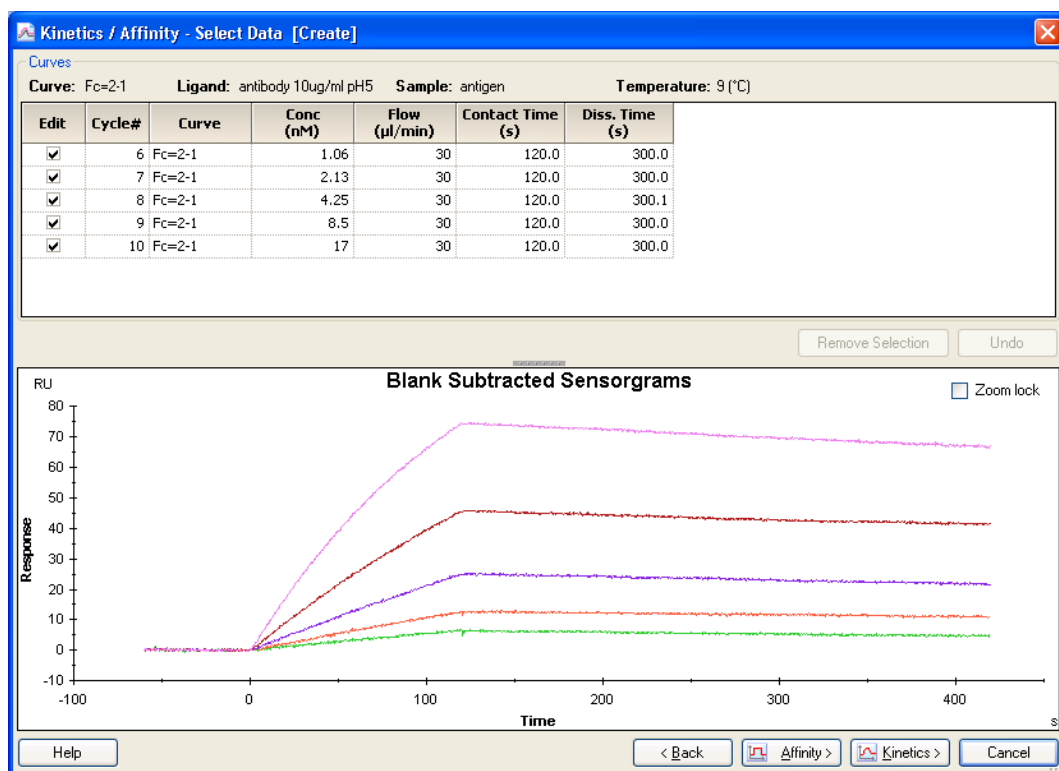
Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

各温度における解離定数（K_D)、反応速度定数（k_a,k_d）を算出します。
詳細は BiacoreT200 日本語取扱説明書 基本操作編を参照してください。

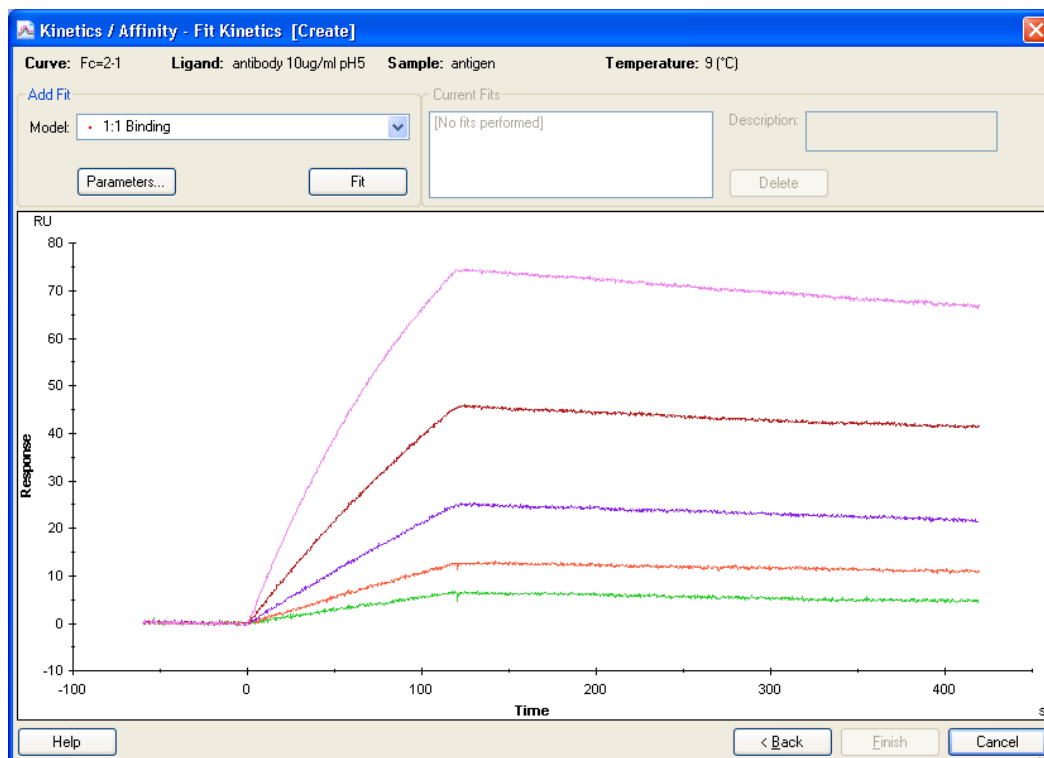
Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックします。

↓

同一温度、同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示されます。

Select Evaluation mode で **Single mode** を選択します。
Next をクリックします。

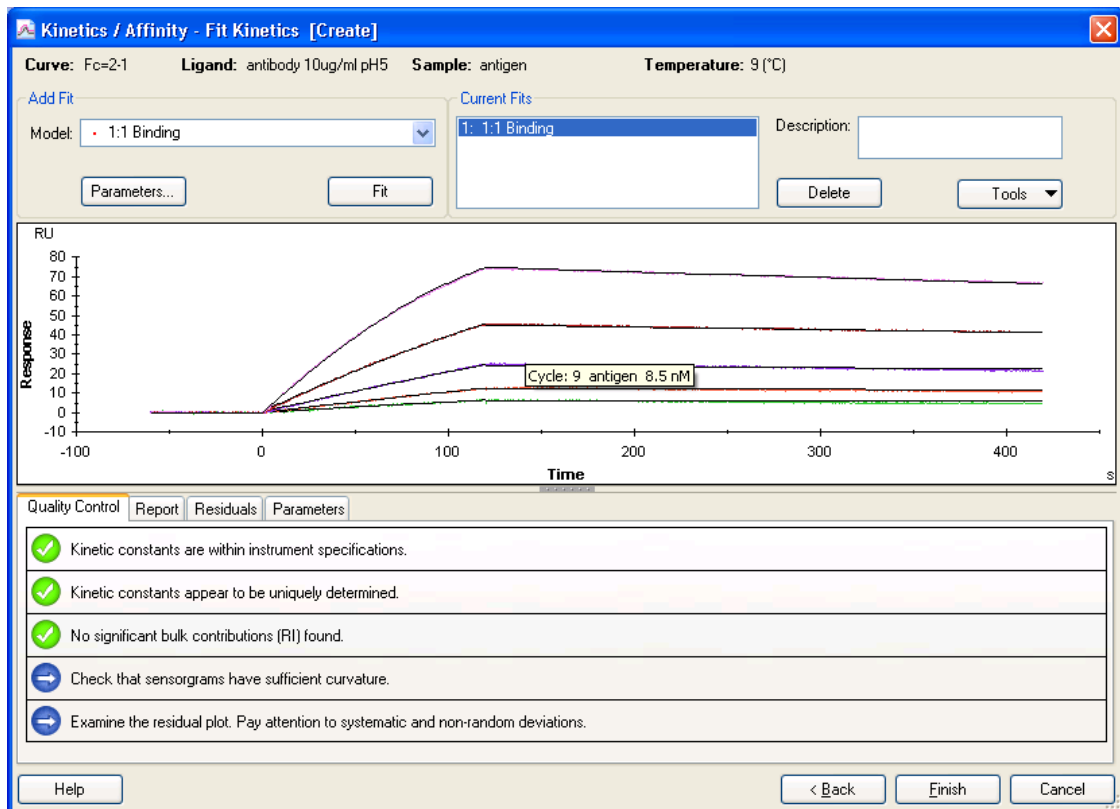
↓

濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれます。

Kinetics をクリックします。

↓

Model:に、1:1 Binding を選択します。**Fit** をクリックします。

↓

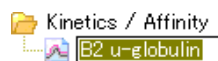
Finish をクリックします。

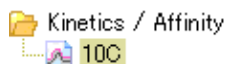
↓

上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。ファイル名は自動的にサンプル名が採用されます。

この実験では、測定温度を変化させて、同一サンプルで同様の実験を行うため、どの温度についての解析結果も同一ファイル名（サンプル名）で保存されます。混乱を避けるため、この時点でファイル名を変更することを推奨します。

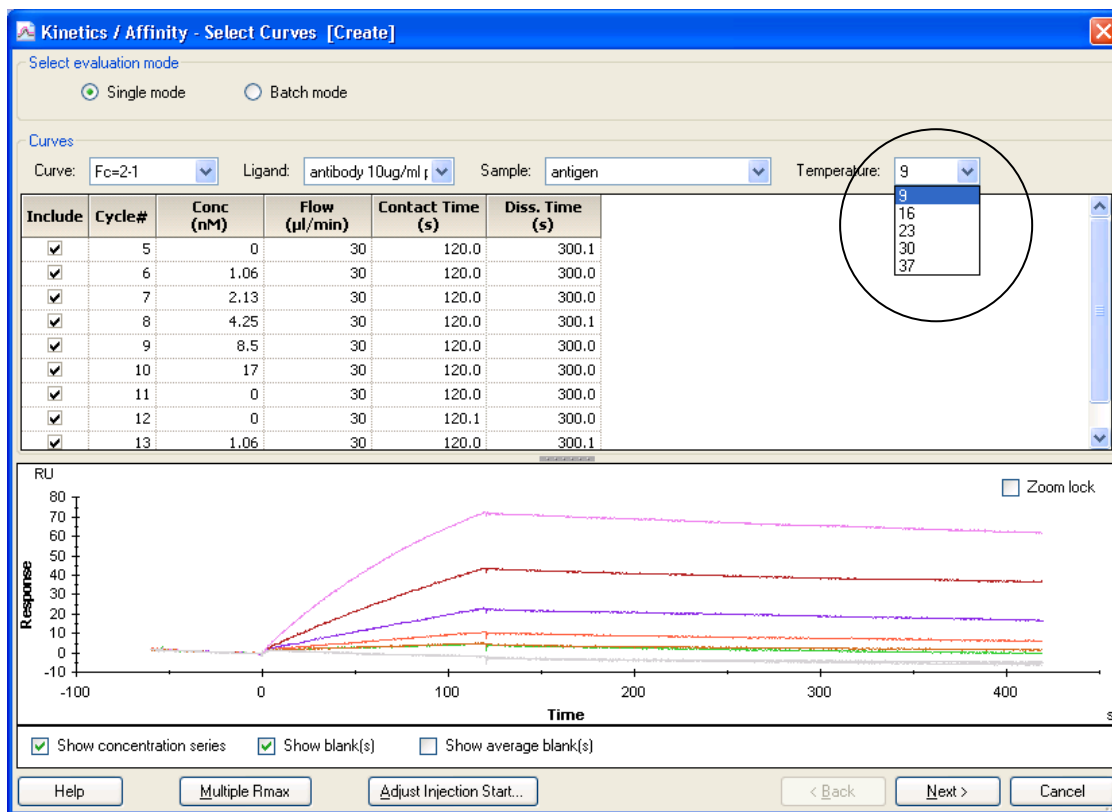
補足 5-7. ファイル名の変更

Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックします。

↓

上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力します。

↓

同様に、別の温度の測定データについても解析します。

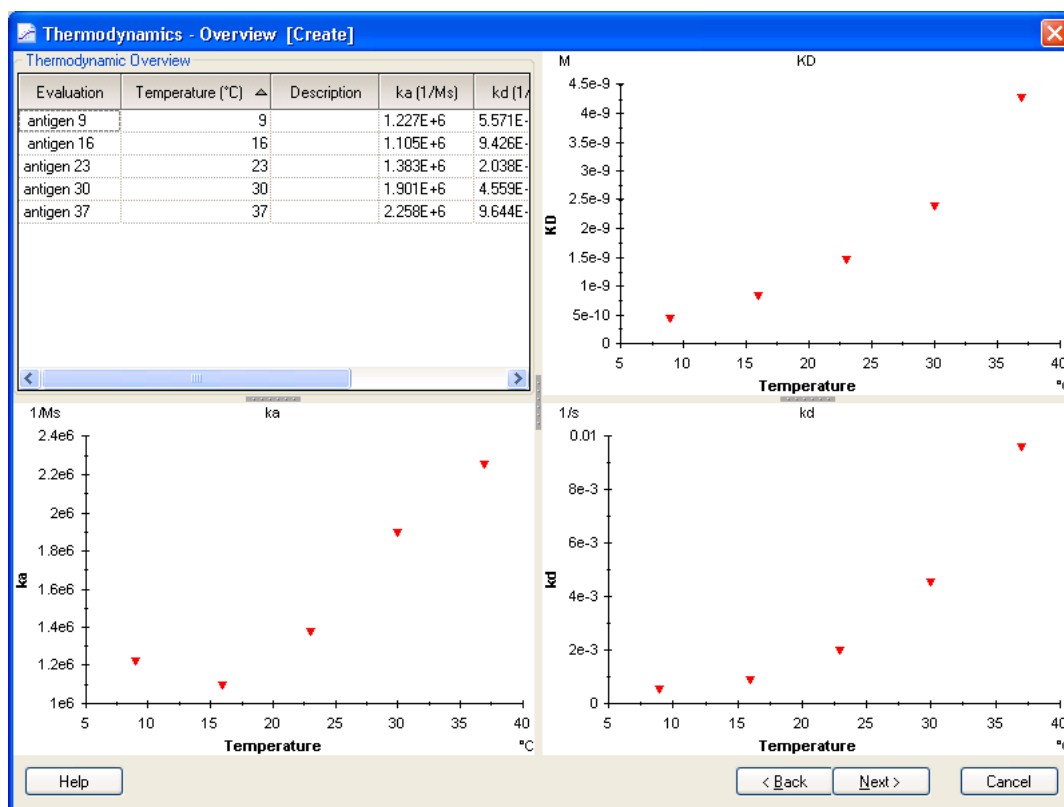
Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックします。

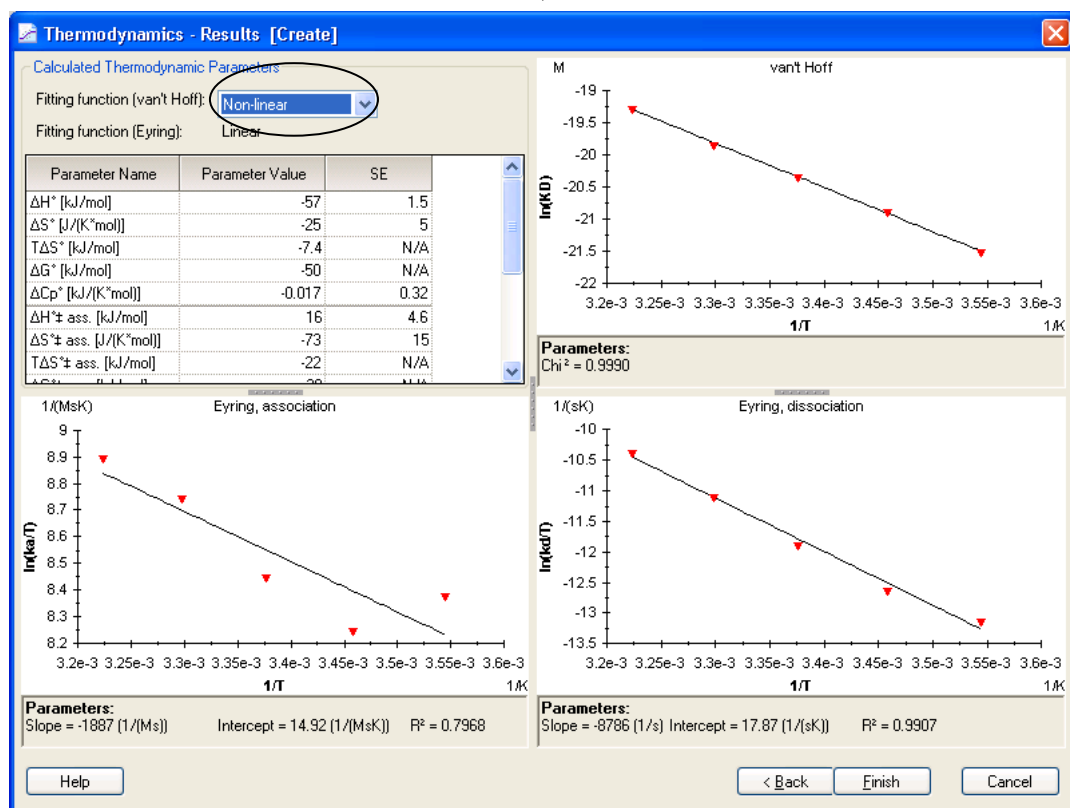
↓

Temperature 右側の▾をクリックします。温度を変更し、反応速度定数（k_a,k_d）を算出します。

↓

すべての温度について解析終了後、Toolbar の Thermodynamics をクリックします。自動的に全解析結果がテーブルに表示されます。

Import をチェックし、Thermodynamics に利用するデータを選択します。**Check All** をクリックするすると、全データが選択されます。**Next** をクリックします。

↓

温度に対する解離定数、反応速度定数のプロットが表示されます。**Next** をクリックします。

↓

▾から、線形解析（Linear）または非線形解析（Non-linear）を選択します。

選択した解析手法の結果が表示されます。

すべての熱力学的パラメータは、左上のテーブルに表示されます。

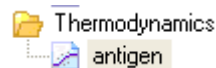
Fitting function (van't Hoff): Non-linear

Fitting function (Eyring): Linear

Parameter Name	Parameter Value	SE
ΔH° [kJ/mol]	-57	1.5
ΔS° [J/(K*mol)]	-25	5
TΔS° [kJ/mol]	-7.4	N/A
ΔG° [kJ/mol]	-50	N/A
ΔCp° [kJ/(K*mol)]	-0.017	0.32
ΔH°‡ ass. [kJ/mol]	16	4.6
ΔS°‡ ass. [J/(K*mol)]	-73	15
TΔS°‡ ass. [kJ/mol]	-22	N/A

Finish をクリックします。

上記解析結果は、Evaluation Explorer 中の Thermodynamics フォルダに追加されます。ファイル名は自動的にサンプル名が採用されます。

Thermodynamics
antigen

6. 結合アナライトの回収

固定化したリガンドに対して結合したアナライトを回収します。再生溶液を添加し、溶出されたアナライトを引き戻すようにして指定したバイアルに回収します。1 回の回収容量はおよそ 2 µl です。効率よく回収するためには、アナライトの添加条件と回収溶液の条件が重要となります。

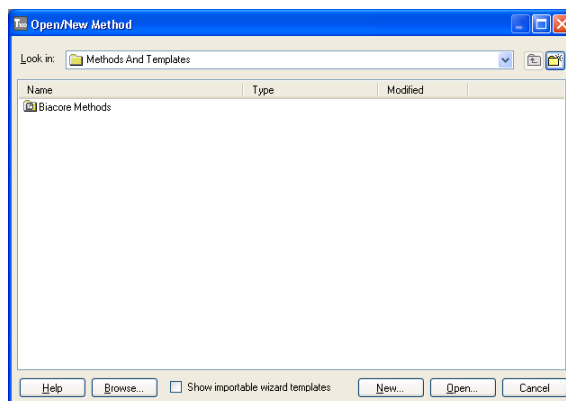
アナライトの添加条件
できるだけ高濃度のアナライトを用いる方が、1 度の添加でより効率よくアナライトを回収することができます。特に低親和性の結合ではアナライト濃度が回収率に大きく影響します。血清等のアナライトの添加では、センサーチップ表面へ非特異的吸着が生じやすく、目的分子以外の分子も回収されます。このような場合には、希釈倍率をあげて非特異的吸着を低減させるなどの検討が必要となります。また、1 度に回収される量は微量であるため、結合量から、何回程度繰り返し結合回収が必要か確認する必要があります。

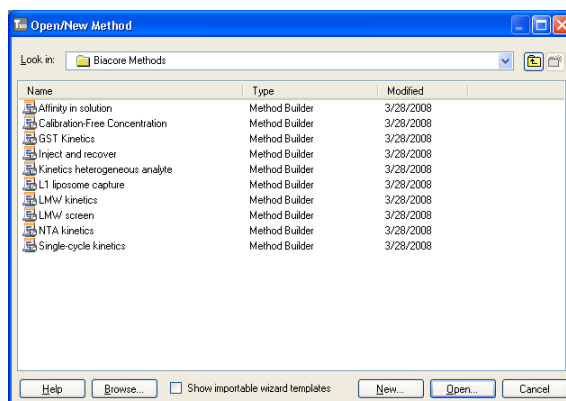
回収溶液
再生溶液が回収溶液となります。再生できなければ、アナライトを回収することができないので、あらかじめ、マニュアル測定で再生条件を検討します。
質量分析に回収サンプルを直接持ち込む場合は、サンプルを酸性化することが必要です。低濃度の酸は、結合したアナライトを再生するのに適している場合が多く、回収溶液に 0.5 % TFA や 0.1 %酢酸を利用すれば、回収サンプル溶液を直接質量分析で解析することができます。質量分析の前に ZipTip（Milipore）などのマイクロ逆相カラムで精製する場合には、回収溶液として、アルカリ溶液（50 mM NaOH など）も使用できます。

回収前の洗浄溶液
相互作用測定時の緩衝液には、質量分析を阻害する成分（例；NaCl、Surfactant P20、DMSO、リン酸緩衝液など）が多く含まれています。回収サンプル溶液中への、これらの成分の混入を抑えるために、アナライト添加直前にセンサー表面や流路を洗浄する必要があります。その洗浄溶液として、炭酸水素アンモニウムなどの揮発性の緩衝液が用いられます。

6-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Method アイコン（ ）または Menu bar の **Run** → **Method** をクリックします。

↓

Biacore Methods をダブルクリックします。

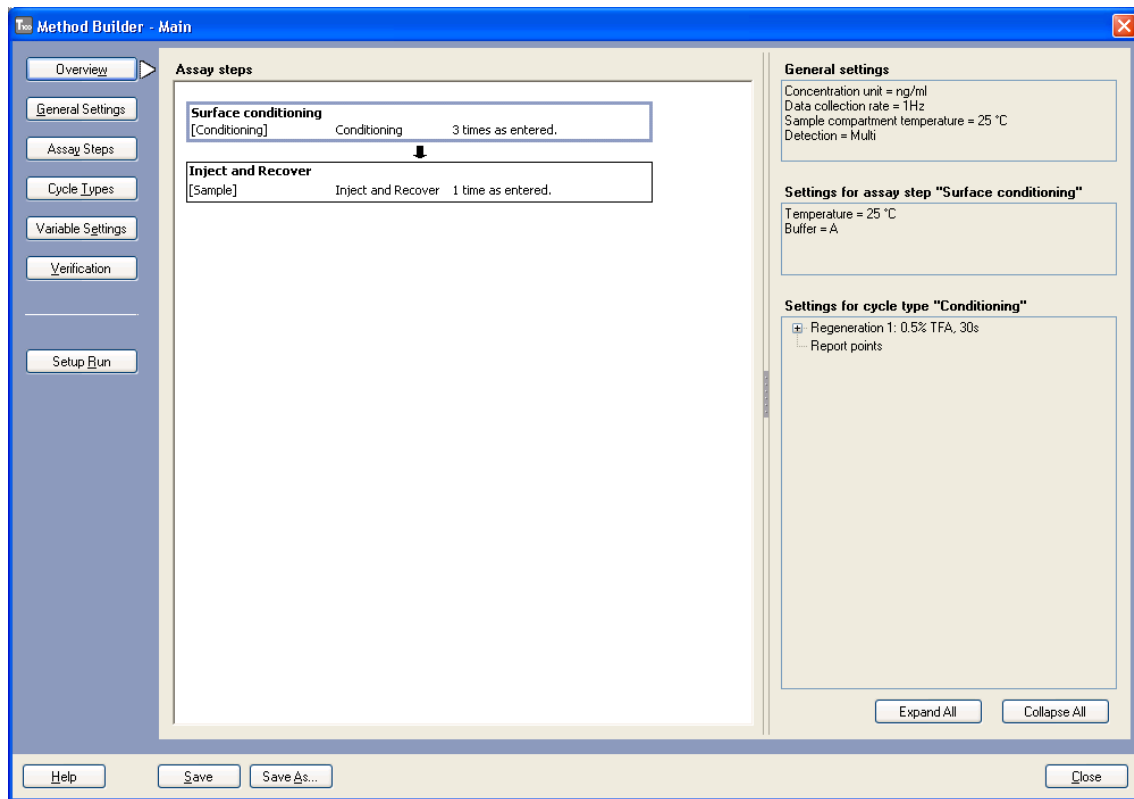
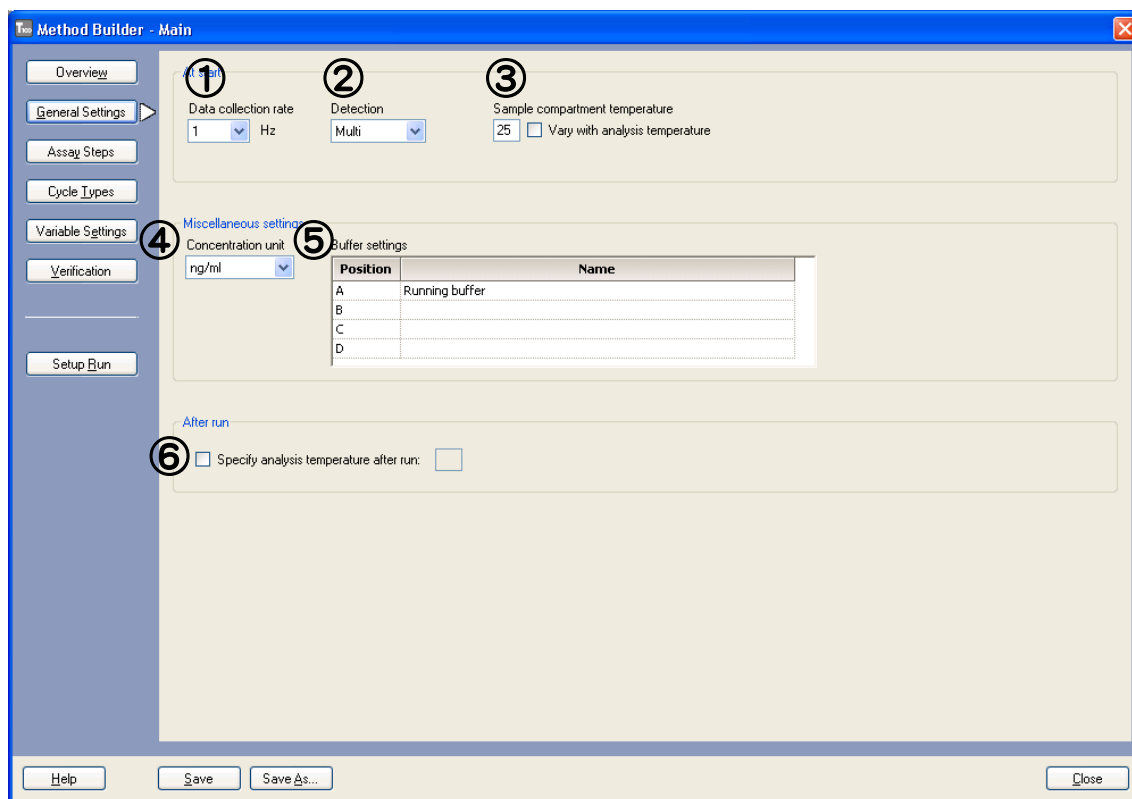
↓

Inject and recover をハイライトにし、**Open** をクリックします。

↓

Method Builder の Main ダイアログが表示されます。

Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は BiacoreT200 日本語取扱説明書 基本操作編を参照してください。

General settings をクリックします。

↓

① Data Collection rate

1Hz を選択します。

② Detection

Multi を選択します。設定の変更不可。1、2、3、4 に流れます。

③ Sample compartment temperature

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定します。通常は、25℃。

④ Concentration unit

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択します。

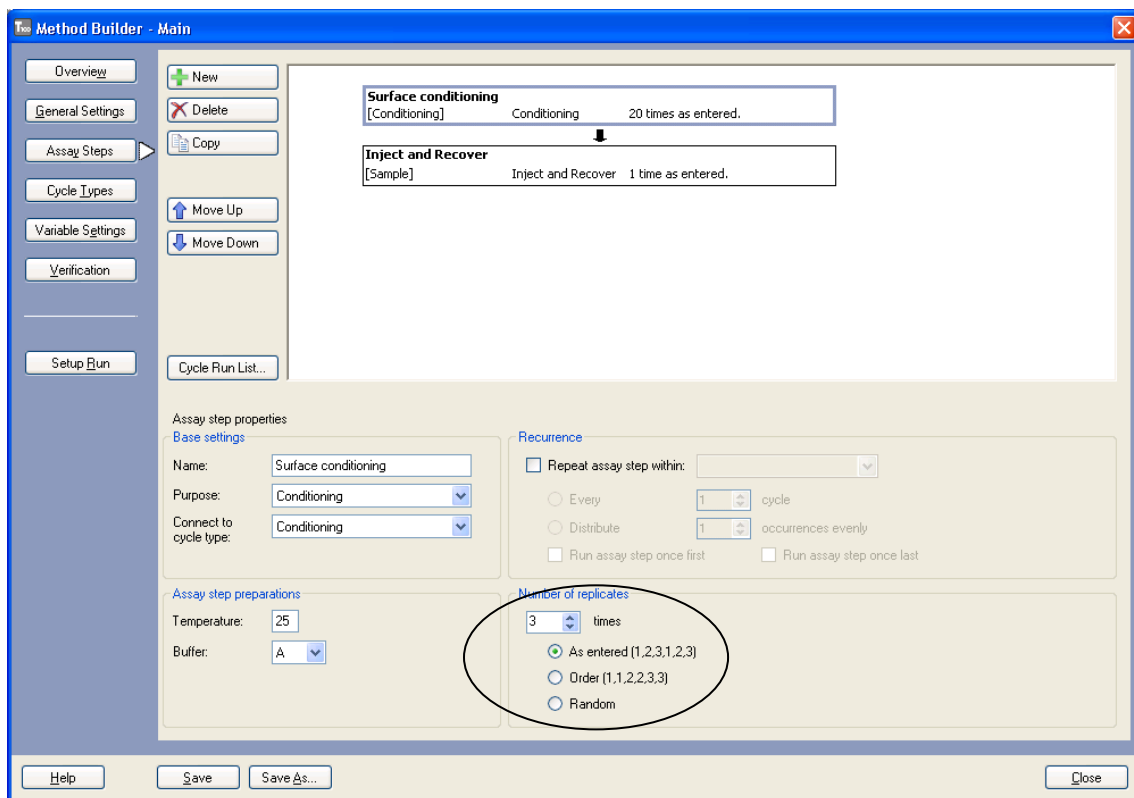
⑤ Buffer settings

使用するランニング緩衝液名を入力します。

⑥ After run

チェックを入れておくと、全測定が終了した後にセンサー表面の温度が指定した温度に自動変更されます。

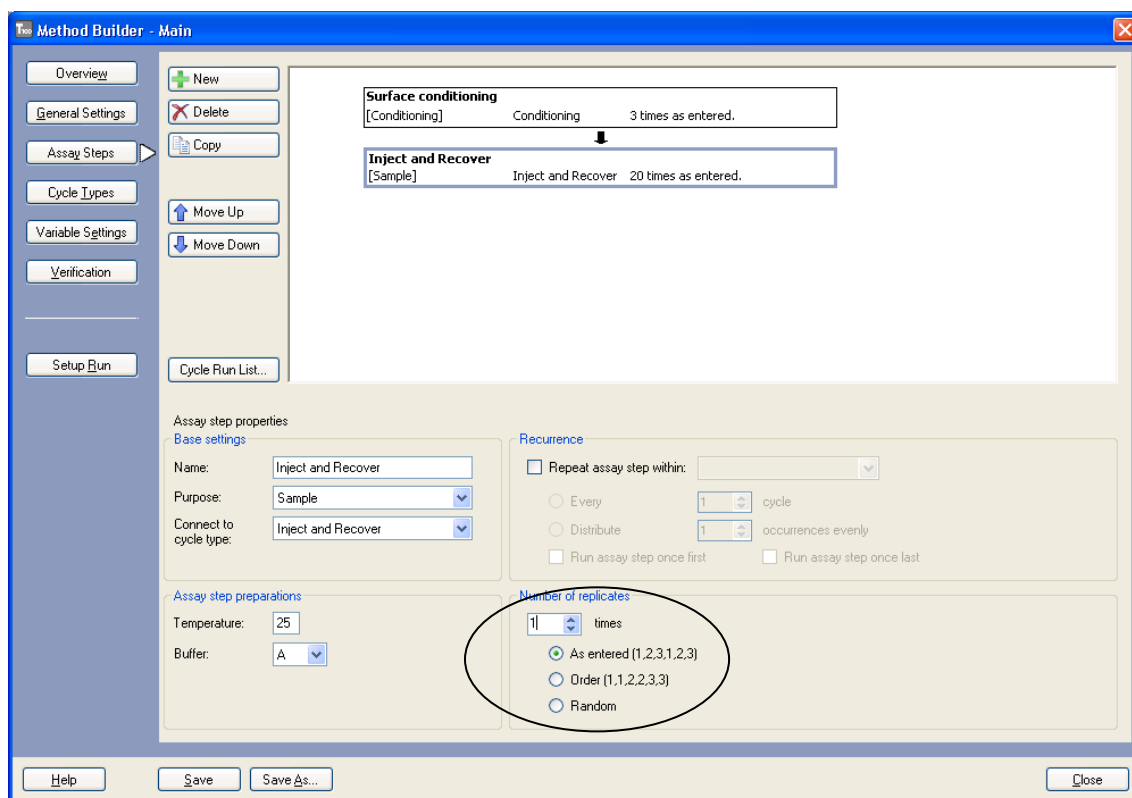
設定後、**Assay Steps** をクリックします。

↓

Number of replicates

Times　　スタートアップの測定回数を指定します。3 回以上を推奨します。

↓

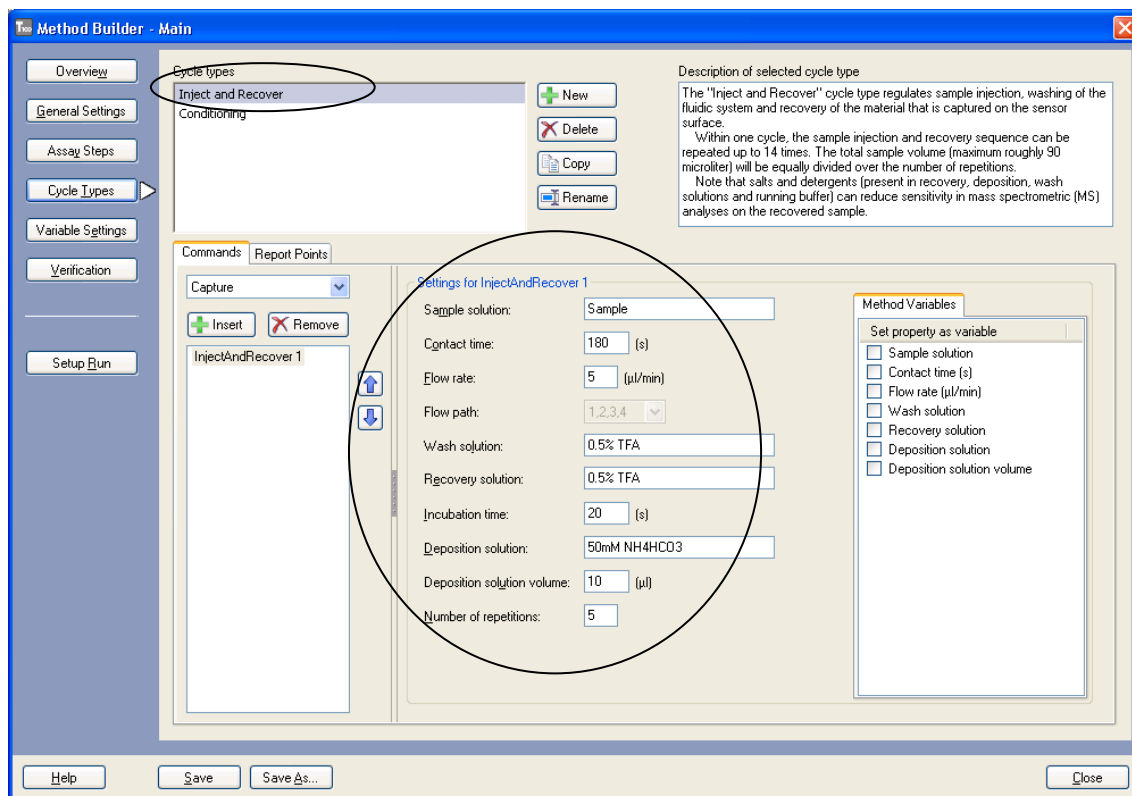
Injection and Recover をクリックします。

↓

Number of replicates

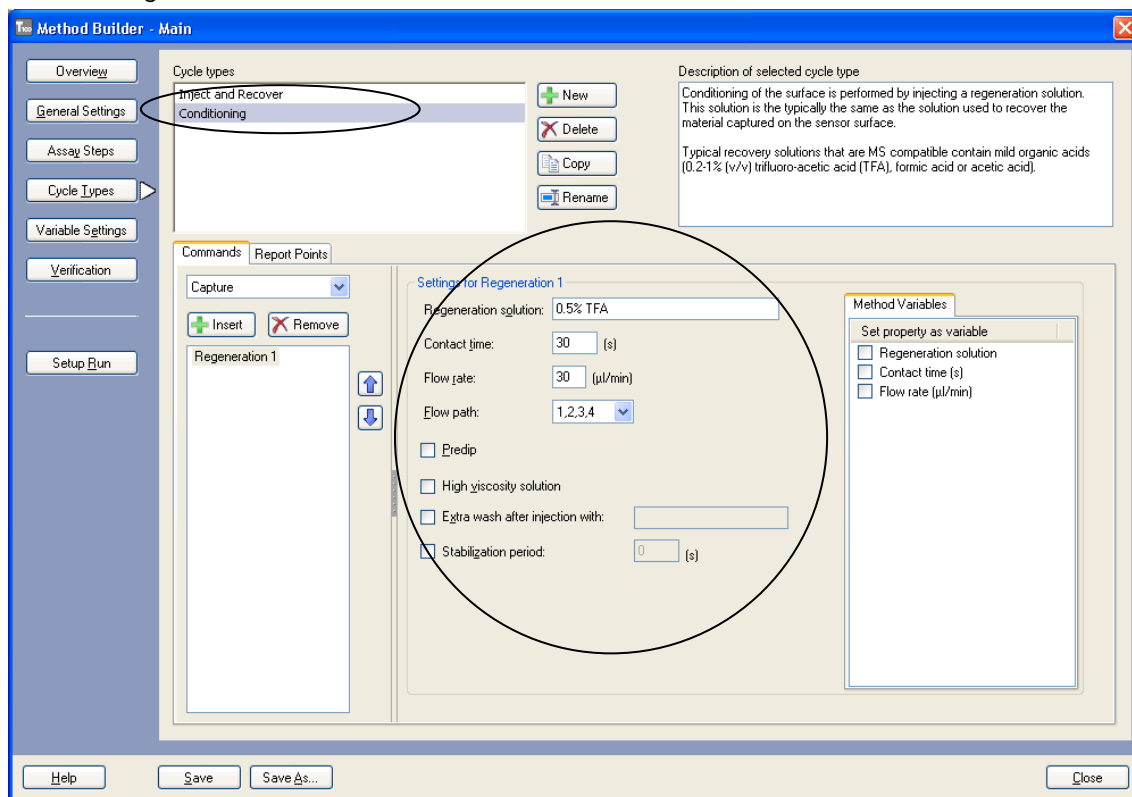
Times　　回収サイクルの実施回数を入力します。

Cycle Types をクリックし、次画面に移動します。

↓

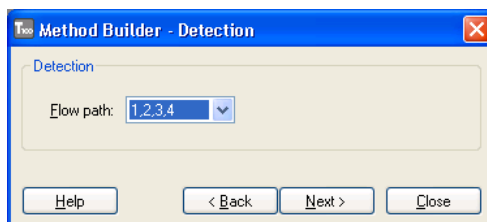
Inject and Recover をクリックします。

Sample solution	アナライトの名称
contact time	アナライト添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	1, 2, 3, 4。変更不可。
Wash solution	アナライト添加前のフローシステムの洗浄溶液
Recovery solution	マニュアル測定で条件検討した再生溶液を入力します。回収溶液は、ランニング緩衝液との希釈を防ぐためにエアーセグメントをはさんでフローセルに添加されます。フローセルに到達したところで流速は 0 になり、接触時間（Incubation time）分留まります。
Incubation time	回収溶液の接触時間（s）を入力します。
Deposition solution	回収溶液を中和する緩衝液を入力します。また、トリプシンやプロテアーゼも使用可能です。 アナライト添加前に､回収先となるバイアルに設定容量分を自動分注します。
Deposition solution volume	中和溶液の分注量（µl）を指定します。
Number of repetitions	1 サイクル中の添加・回収回数を入力します。最大 10 回まで可能です。回収量を稼ぎたい場合に設定します。

↓

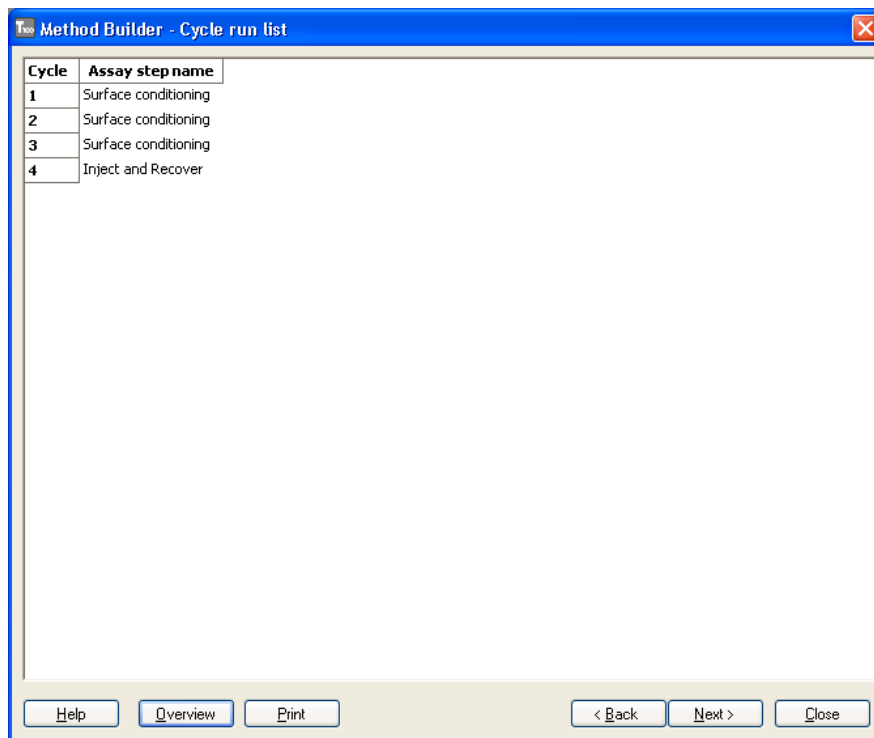
Conditioning をクリックします。

回収サイクル前のセンサーチップのコンディショニング条件を設定します。

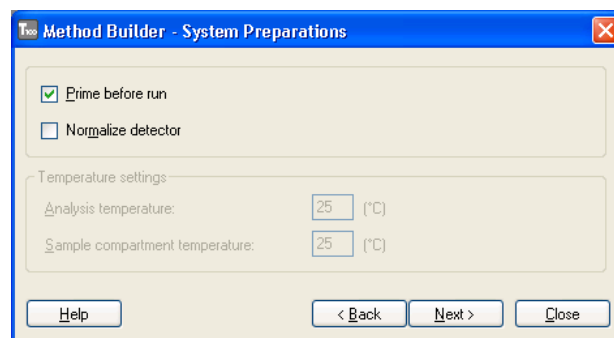
Regeneration solution	再生溶液を入力します
contact time	添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	1, 2, 3, 4 を選択します

Setup Run をクリックします。

↓

Flow path:	1, 2, 3, 4 を選択します

Next をクリックします。

↓

測定サイクルリストが表示されます。

Next をクリックします。

↓

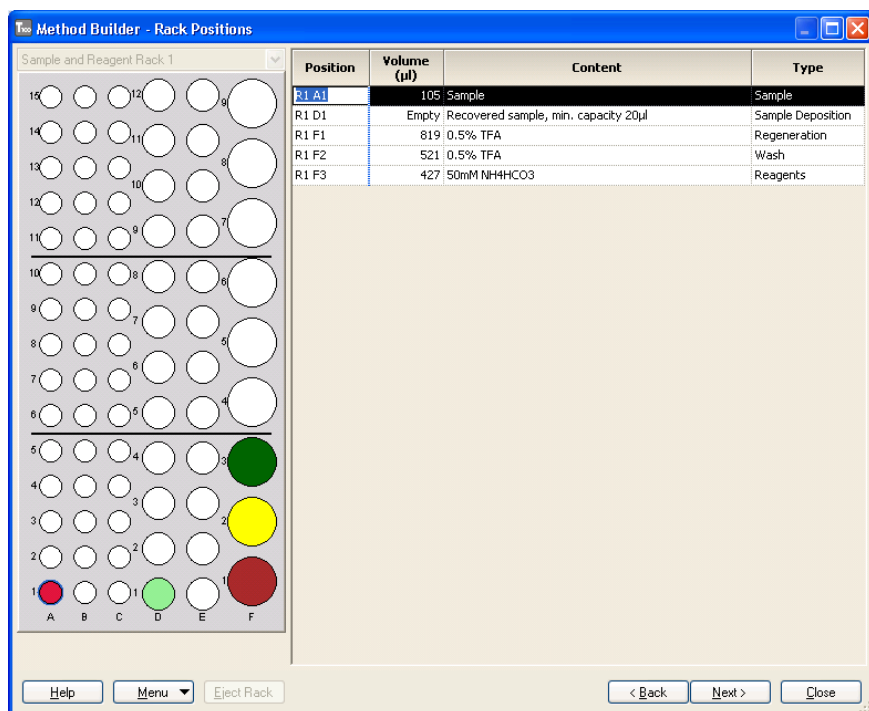
測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

Temperature settings

Analysis temperature　25 ℃

Sample compartment temperature　25 ℃

Next をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 6-1. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。

Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓

ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、**OK** をクリックします。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の **Next** をクリックします。

↓

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。

Start をクリックします。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

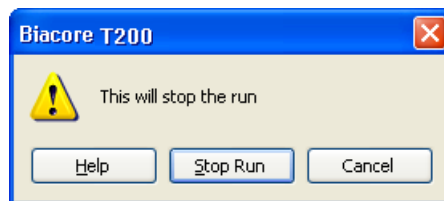
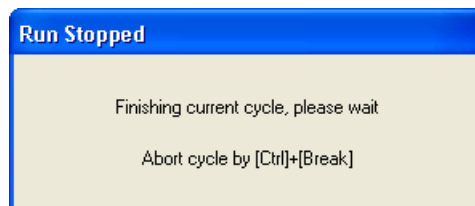
↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

↓

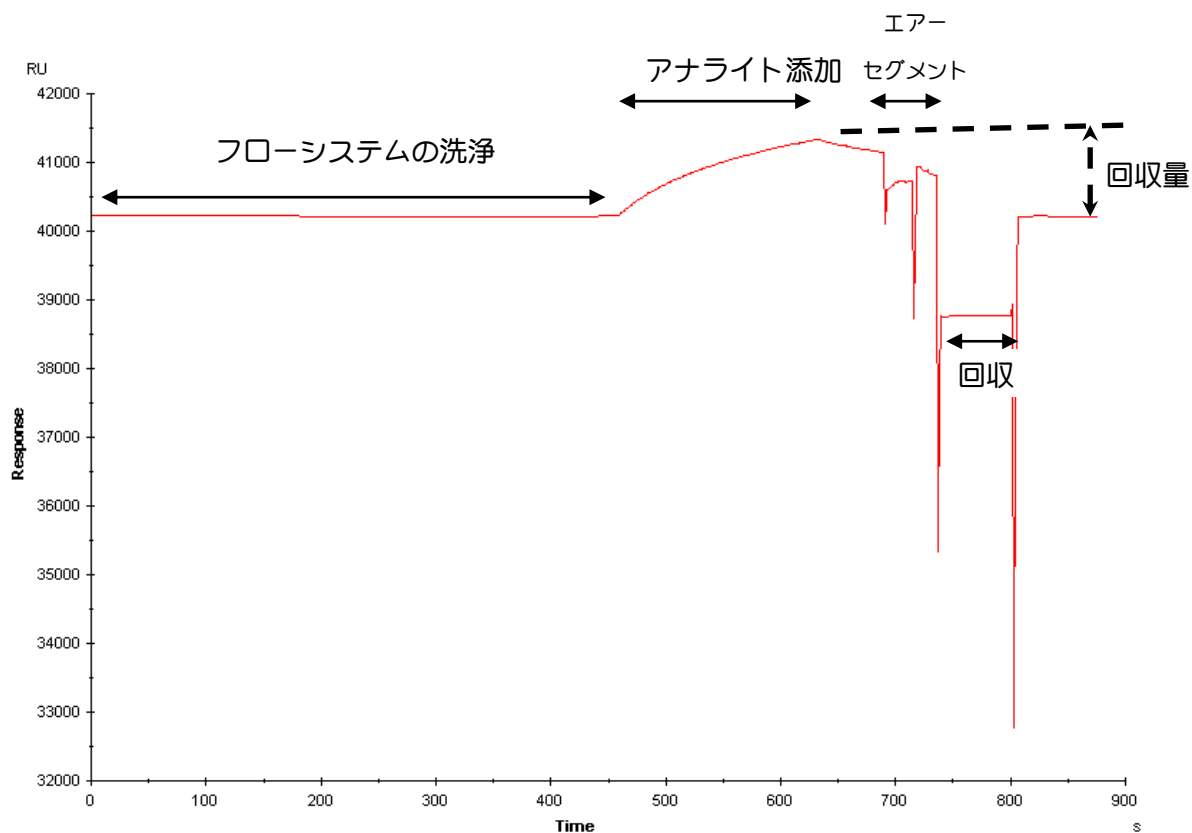
測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

補足 6-2. プログラムの緊急停止

Run→Stop Run をクリックします。

ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

回収のセンサーグラム

回収の評価

1000 RU は約 1 ng/mm^2 の質量変化に相当します。

回収操作終了後 60 秒後に、結合レスポンス（bound）を相対値 0 として計算した回収レスポンス（recovered）が得られます。4 つのフローセルの面積の合計は約 5.8 mm^2 なので、何 ng 回収できたかを推測することができます。回収レスポンスは、測定結果のレポートポイントテーブルを参照してください。

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
2	440.0	5	40218.2	0.53	0.60	0.00	0.0	Yes	baseline_1
2	680.0	5	41173.9	4.94	0.08	-2.64	955.7	Yes	bound_1
2	885.0	5	40108.7	238.03	199.27	84.33	-1065.2	No	recovered_1

7. 免疫原性試験

人体が異質なタンパク質にさらされると、免疫応答が起こります。慎重に設計され、構築されたタンパク質治療薬でも、異質なタンパク質としてみなされ、治療薬を認識する抗体の産生を引き起こすかもしれません。このような応答は治療効果を低下させ、場合によっては生命に係わる免疫反応を惹起します。今日、タンパク質治療薬の開発において抗薬物抗体（Anti drug Antibodies: 以下 ADAs と略します）の測定は申請の必須項目となっています。Biacore T200 を用いた ADAs の検出では、Drug-ADAs 複合体を一時的に解離した状態で測定する Merged Inject 法または Double Mix 法を使用することで､ADAs を高感度に検出できます。血中に存在する薬物の濃度や、抗体のアフィニティーに関係なく、安定的な ADAs の検出を行うことができます。さらに、免疫原性試験スキームとして、阻害法による擬陽性の確認試験、ADAs のアイソタイプの同定試験、ADAs の成熟度（結合安定性）の確認試験があります。

Merged Inject 法

Drug – ADAs 複合体を酸性化することで、ADAs を薬物から解離させた後、薬物（リガンド）を固定化したフローセルに流れる直前に、中和溶液と混合してサンプル溶液を中性化後、添加する方法です。フローセル 1 およびフローセル 2 を通る間に中和溶液と混合しますので、リガンドはフローセル 3 に固定化します。ADAs の結合速度が速く、中和後、薬物と速やかに再結合する場合は、Merged Inject 法の利用を推奨します。

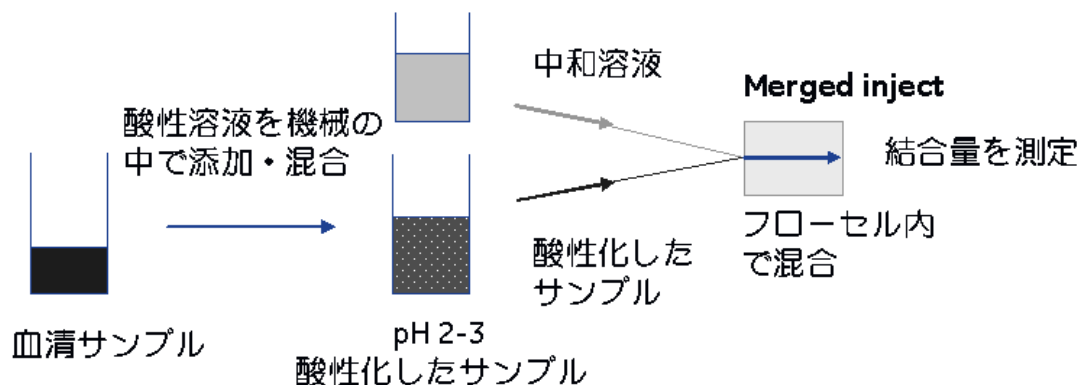



図 1. Merged Inject 法のイメージ

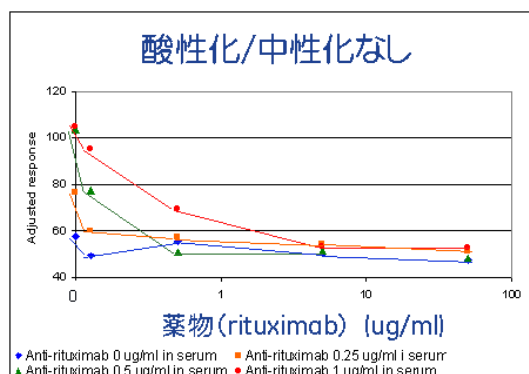



図2. サンプル中の薬物濃度変化におけるADAsの結合量の変化（酸性化/中性化なし）

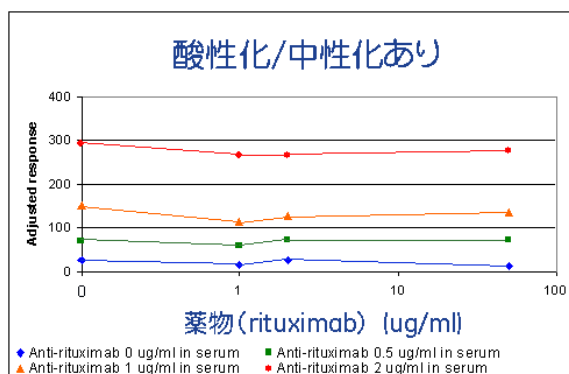



図3. サンプル中の薬物濃度変化におけるADAsの結合量の変化（酸性化/中性化あり）

Double Mix 法

Drug – ADAs 複合体をマイクロプレートのウェル内で、酸性化および中和後にフローセルに添加する方法です。ADAs の結合速度が遅く、中和後に再結合するまで時間がかかる場合や、酸性化することで薬物が破壊され、複合体形成の可能性がない場合は、Double Mix 法が利用できます。

至適条件

センサーチップ	固定化量を確保して非特異吸着を低減するため、Sensor Chip CM5 の使用を推奨します。
リガンド固定化手法	固定化量を確保するため、アミンカップリング法を推奨します。
固定化フローセル	Merged Inject 法を使用する試験では、Fc3 と 4 にリガンドを固定化してください。(Fc4 では ADAs と抗原が再結合して感度が低下することがあるため、Fc3 での評価を推奨します。)
リガンド固定化量	固定化量が多いほど検出感度が上がります。150 kDa 程度の分子量であれば、7,000 RU～15,000 RU の固定化量を目指してください。
リファレンスの差し引き	サンプル添加後の結合レスポンスおよび解離領域で評価するため、必要ありません。ただし、センサーチップ表面への非特異的吸着を低減するためのサンプル処理が必要です。
ランニング緩衝液	HBS-EP+を推奨します。

サンプルの前処理

遠心またはフィルターろ過による不溶性成分の除去が必要です。（Merged Inject 法を使用する場合には血清は希釈せずに使用します。）

非特異吸着の低減

血清サンプルは、血清中の夾雑物がセンサーチップ表面のデキストランに非特異的吸着します。非特異的吸着を低減するため、デキストラン（NSB Reducer；コード番号　BR-1006-91）をサンプル溶液に混合してください（Merged Injection 法では効果が低いため使用しません)。終濃度の目安は 1 mg/mL です。HBS-EP+をランニング緩衝液として使用していない場合には、HBS-EP+に相当する濃度の塩（150 mM NaCl)、界面活性剤（0.05% Surfactant P20）を混合してください。

コントロールサンプル

ネガティブコントロールとして、薬物が投与されていない血清を使います。ポジティブコントロールとして、ネガティブコントロールに抗体を添加したものを使います。繰り返し測定によるリガンドの失活が起きている場合やリガンドへの非特異的吸着が起きている場合には、それらの因子についてネガティブコントロールおよびポジティブコントロールの結合量を利用して、検体の結合量を補正することができます。補正するためには、1 測定につき 4 回、コントロールの測定を実施してください。ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールは 1 種類あれば十分です。

温度設定

Merged Injection 法では、測定温度が高いと酸性化サンプルがフローセル 1 および 2 を通過する際にセンサーチップ表面に非特異的吸着が起きます。温度が低い程、センサーチップ表面に対する非特異的吸着を抑制できるため、Analysis temperature および Sample compartment temperature はいずれも 10℃を推奨します。

通常の添加および Double Mix 法を使用する測定では、Analysis temperature は 25℃　s Sample compartment temperature は 10℃を推奨します。

ただし、10 ℃で沈殿する緩衝液成分や再生溶液（例：guanidine-HCl）を使用する際には、ご注意ください。

酸性化・中和溶液

Merged Injection 法

酸性化溶液；0.12 M HCl, 0.1 % Surfactant P20

中和溶液；1.3 M Tris-HCl, 0.05 % Surfactant P20, pH 8.5

＊固体の Tris-HCl を、終濃度 1.3 M になるよう超純水を用いて溶解し、4 M NaOH を用いて pH 8.5 に合わせます。最後に Surfactant P20 を加えて調製します。使用期間は 1 週間です。

Double Mix 法

酸性化溶液；0.12 M HCl, 0.1% Surfactant P20

中和溶液；1.0 M Tris-HCl, 0.05% Surfactant P20, pH 8.0

＊固体の Tris-HCl を、終濃度 1.0 M になるよう超純水を用いて溶解し、4 M NaOH を用いて pH 8.0 に合わせます。最後に Surfactant P20 を加えて調製します。使用期間は 1 週間です。

再生条件

10 mM Gly-HCl pH1.5 – 2.5 の範囲で、30 秒添加することで再生できることが多いです。ただし、条件検討は必須です。条件検討では、ポジティブコントロールとして使用している抗体を用いてください。この時、抗体はランニング緩衝液に希釈したものを用います。再生条件が決定できた上で、抗体をスパイクした血清を用いて、再生条件の確認を行ってください。また、測定温度により再生条件は異なるため、測定予定の温度で条件検討を行ってください。

なお、再生溶液添加後には、20% isopropanol, 40mM NaOH による Extra wash を実施してください。血清の流路への吸着を洗浄・除去します。

増幅試薬

ADAs の結合レスポンスが小さく、評価しにくい場合は、2 次抗体など用いて、結合量を増幅させることができます。ADAs のアイソタイプやサブクラスなどが不明な場合は、考えられるアイソタイプやサブクラスに対する 2 次抗体を混合した溶液を用いてください。リガンドとして固定化している薬物が抗体であれば、抗 human IgG lambda 抗体や抗 human IgG kappa 抗体を用いることもできます。

システムのメンテナンス

測定終了ごとに、Desorb を実施してください。月に 1 度、Desorb

and Sanitize およびシステムチェックを実施してください。

Cut-off 値の計算方法

ネガティブコントロールサンプルのレスポンスの平均値 + SD（標準偏差）x 1.645

（ネガティブコントロールとして、95 %信頼できる値として計算した場合の式となります。参照文献 Mire-Sluis, A. R. Et al 2004, J. Immunol.Methods 289, 1-16）

なお、wizard の Immunogenicity Screening および Immunogenicity Isotyping で、Merged Injection または Double Mix 法を使用する場合には、96 well microplate のみ使用できます。（384 well microplate は使用できません。）

7-1. スクリーニング

7-1-1. プログラムの実行（Merged Inject 法の場合）

Toolbar の Run Wizard アイコン（ または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。

Immunogenicity → Immunogenicity Screening を選択した後、**New** をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、**Open** をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、**Browse** をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして **Open** をクリックします。

↓

〇**Acidification and neutralization** にチェックします。**Next** をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Enhancement および Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。

Next をクリックします。

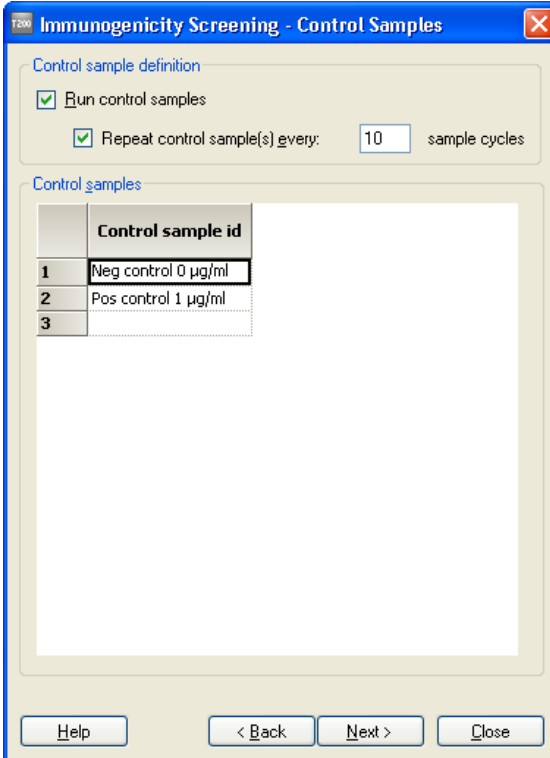
↓

ダミーランを設定します。ダミー用のサンプルは、ポジティブコントロールを用います。3 回以上の実施を推奨します。

Next をクリックします。

↓

それぞれの項目における溶液名、添加時間、流速を入力します。（上記画面は、2 次抗体の添加、2 種類の再生溶液の添加を想定した例となります。）**Next** をクリックします。

↓

サンプル名を入力します。Cut-off 値を決めるためのネガティブコントロールサンプルは、サンプル名に blank と入力すると、測定値を抽出するのに便利です。Run order を設定し、**Next** をクリックします。

↓

コントロールサンプルを測定する場合は、Run control samples をチェックし、さらに繰り返し測定する場合は、Run control sample(s) every をチェックします。測定頻度は、10 サンプルもしくは 20 サンプル毎が推奨です。コントロールサンプル名を入力し、Next >をクリックします。

↓

温度が低いほど非特異吸着を抑制できるため、Analysis temperature および Sample compartment temperature いずれも 10℃を推奨します。ただし、10℃にすることで沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）最後に測定の流れを確認する場合は、**Cycle Run List** をクリックします。**Next** をクリックします。

↓

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 7-1. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の **Menu→Export Positions** を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、**Menu→Sample Position Import** でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。**Start** をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

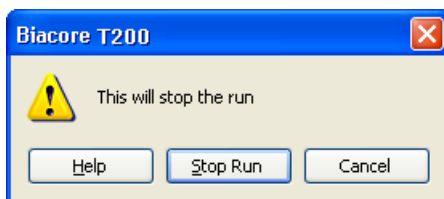
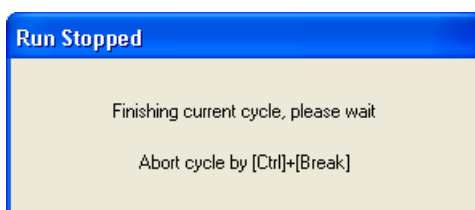
↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 7-2. プログラムの緊急停止

Run→Stop Run をクリックします。

ボックス中の **Stop Run** をクリックします。

↓

Run Stopped

Finishing current cycle, please wait

Abort cycle by [Ctrl]+[Break]

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押してください。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

7-1-2. プログラムの実行（Double Mix 法の場合）

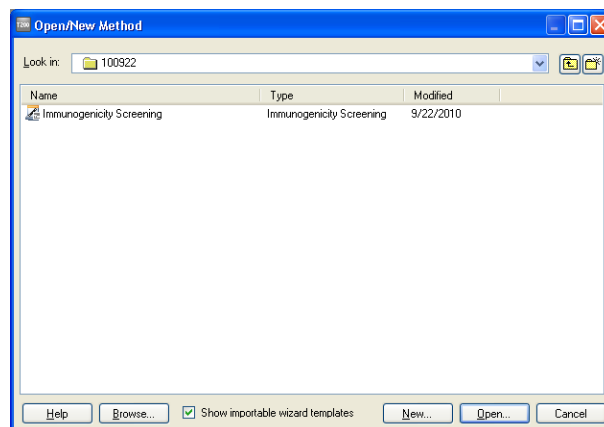
7-1-1 章に従い、Immunogenicity Screening ウィザードを用いてプログラムを作成し、保存します。保存したウィザードを用いて、メソッドによりプログラム内容を変更します。
Toolbar の Run Method アイコン（　）または Menu bar の **Run→Method** をクリックします。

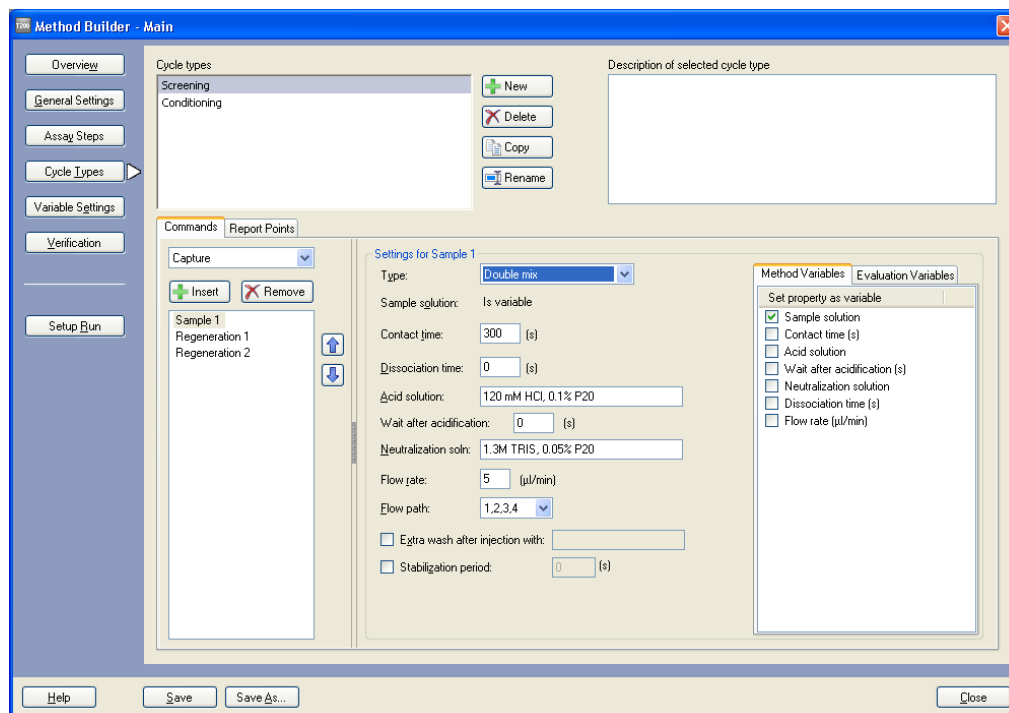
↓

ウィザードを保存したフォルダを指定し、**Show importable wizard templates** をチェックします。

↓

目的のプログラムをハイライトにし、**Open** をクリックします。

↓

Method Builder の Main ダイアログが表示されます。
Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は Biacore T200 日本語取扱説明書 基本操作編を参照してください。

（Cycle Types）

Sample コマンドの設定を変更します。Type を Double mix に変更し、Acid solution および Neutralization soln の項目に、Double mix 時の推奨条件を入力します。

7-1-3. データ解析

ウィザードもしくはメソッドを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

補足 7-3. サンプル情報の変更

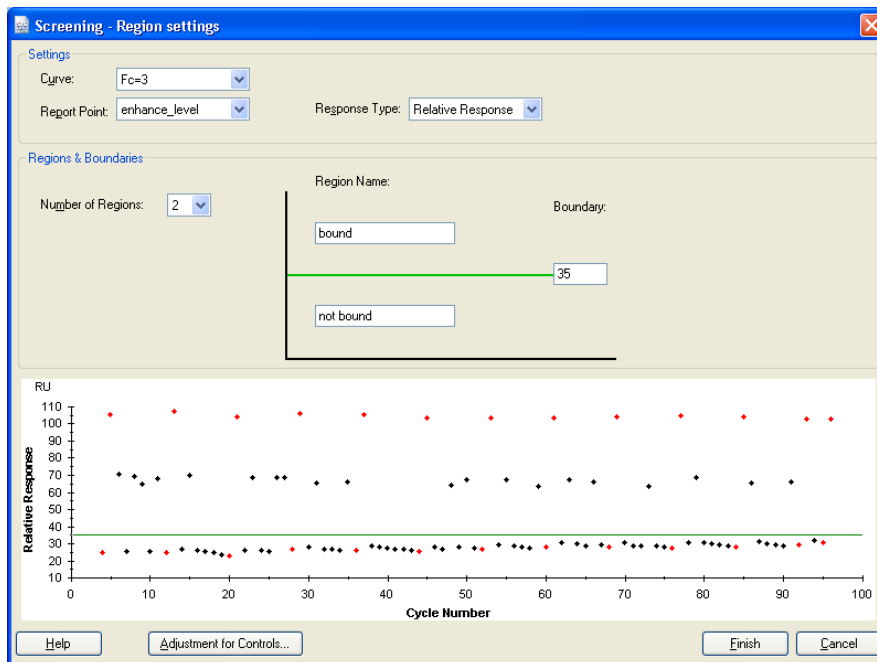
サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。

リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。

補足 7-4. 画面の説明

Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Immunogenicity をクリックし、Screening を選択します。

↓

画面下部に、サイクルごとにおける結合量がプロットされます。赤色のプロットはコントロール、黒色のプロットはサンプルです。

Settings

Curve;	Fc=3 を選択します
Report Point;	2 次抗体を利用して結合量を増幅している場合は、enhance_level 2 次抗体を使用していない場合は、stability を選択します

Regions&Boundaries

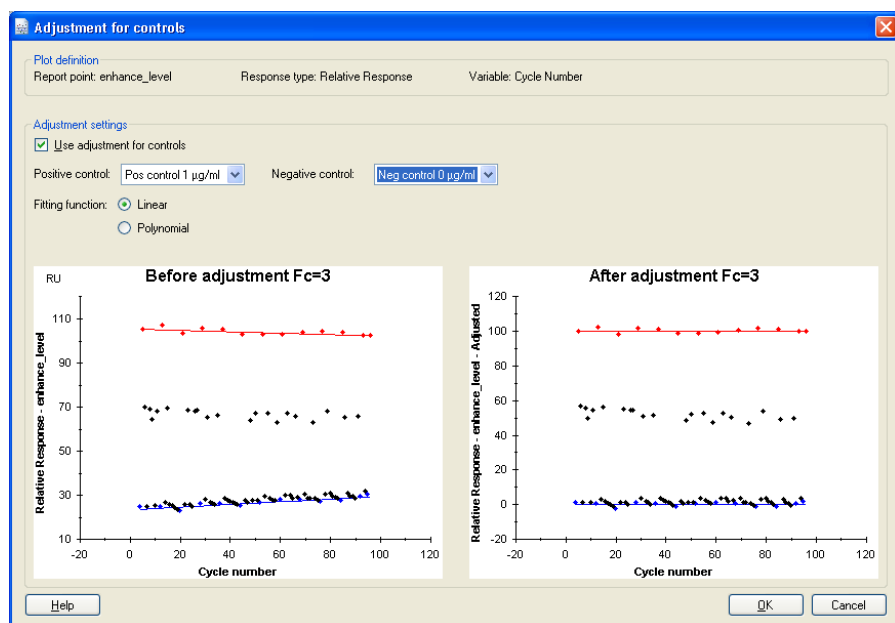
Number of Regions;	評価基準の数を設定します
Boundary;	評価基準となる数値を入力します
Region Name;	評価基準に対するカテゴリーごとの名称を入力します

Finish をクリックします。

補足 7-5. コントロールサンプルによる結合量補正

経時的にリガンドが失活する場合や、再生条件が不十分な場合には、サイクルごとにリガンドの結合キャパシティーが低下しています。コントロールサンプルを定期的に測定している場合には、コントロールサンプルの結合量低下が確認できます。この場合、結合量のランキングを正確に把握できません。正確なランキングを行うためには、コントロールサンプルの結合量に基づき、リガンドの最大結合量を考慮し、結合量を補正します。

Adjustment for Controls をクリックします。

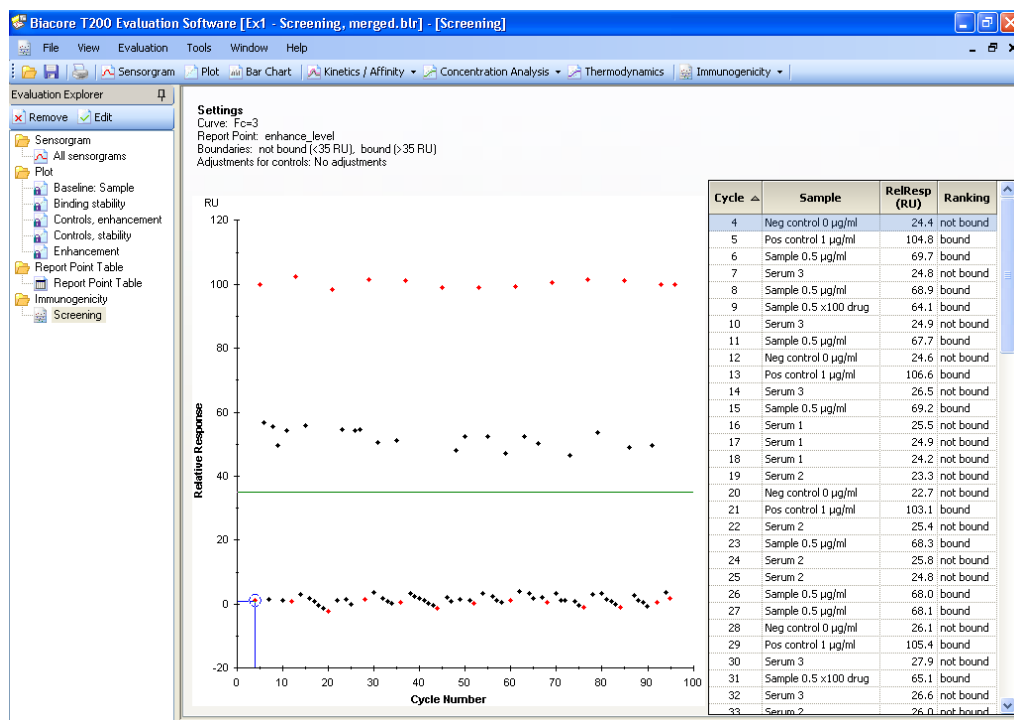
↓

Adjustment settings

Use adjustment for controls にチェックします

Positive control;	利用するポジティブコントロールを選択します
Negative control;	利用するネガティブコントロールを選択します
Fitting function;	フィッティングに利用する式を選択します
	Linear（線形式）または Polynomial（多項式）を選択します

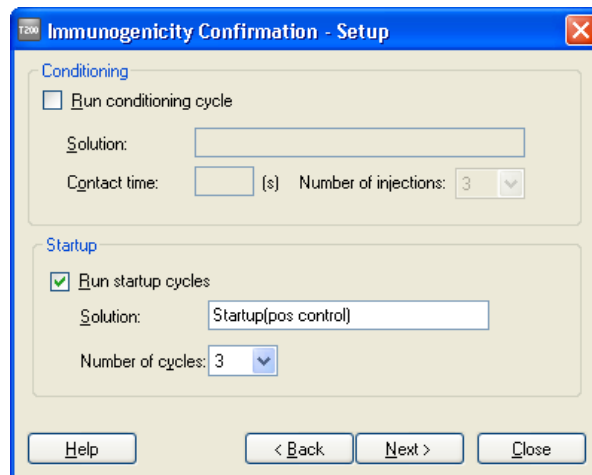
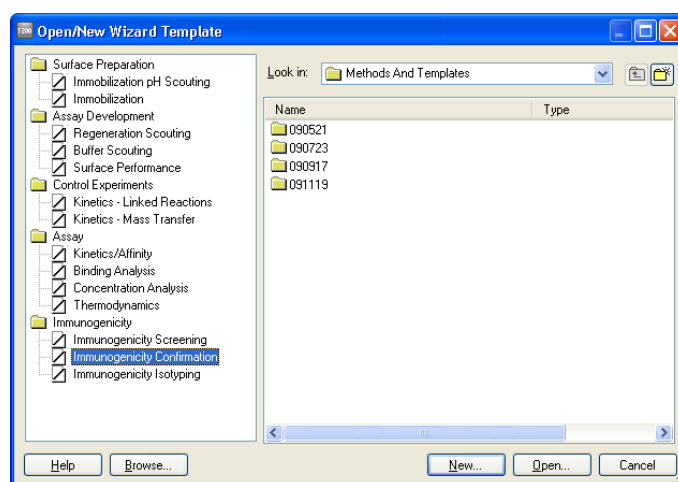
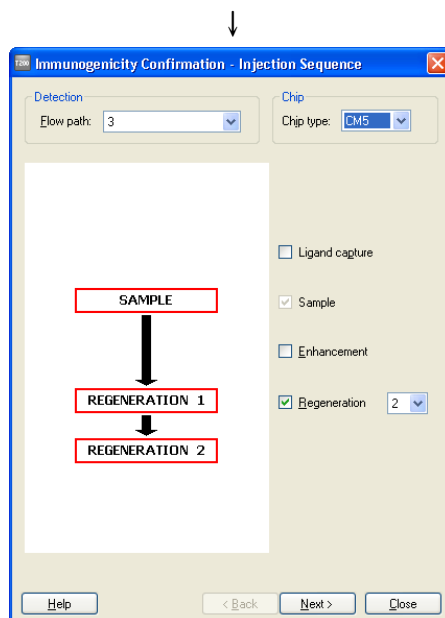
ウインドウ右側に補正後のプロットが表示されます。ポジティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=100 で、ネガティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=0 で表示されます。

OK をクリックすると、補正後のプロットが表示されます。

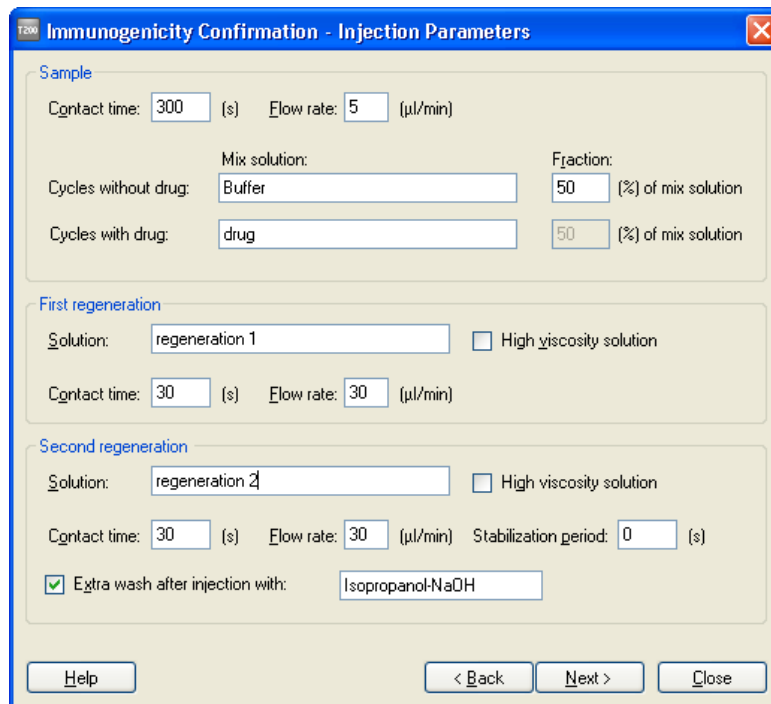
↓

評価基準で設定した値にラインが引かれます。同時に、右表には、評価基準に対して属するカテゴリーの名称が、Ranking カラムに入力されます。上段のカラムをクリックすると、昇順および降順の並び替えが可能です。

7-2. 阻害法を利用した ADAs の同定

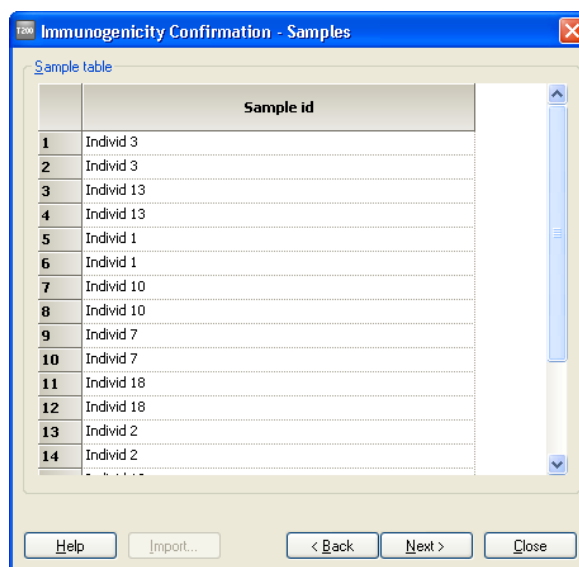
スクリーニングで陽性だったサンプルについて、阻害法によって ADAs の同定を行います。サンプルおよびサンプルに薬物を混合した溶液を、薬物固定化表面に添加して、結合量の低下の有無から ADAs を同定します。添加はダイレクト法を使用します。

7-2-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の **Run → Wizard** をクリックします。

Immunogenicity → Immunogenicity Confirmation を選択した後、**New** をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Enhancement および Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。**Next** をクリックします。

↓

ダミーランを設定します。ダミー用のサンプルは、ポジティブコントロールを用います。3回以上の実施を推奨します。**Next** をクリックします。

↓

Immunogenicity Confirmation - Injection Parameters
Sample
Contact time: 300 (s) Flow rate: 5 (µl/min)
Mix solution: Fraction:
Cycles without drug: Buffer 50 (%) of mix solution
Cycles with drug: drug 50 (%) of mix solution
First regeneration
Solution: regeneration 1 High viscosity solution
Contact time: 30 (s) Flow rate: 30 (µl/min)
Second regeneration
Solution: regeneration 2 High viscosity solution
Contact time: 30 (s) Flow rate: 30 (µl/min) Stabilization period: 0 (s)
Extra wash after injection with: Isopropanol-NaOH
Help < Back Next > Close

測定直前に、サンプルに緩衝液または薬物を混合します。Sample 項目では、Cycles without drug には Buffer を、Cycles with drug には薬物名を入力します。Fraction では混合比率を入力します。サンプル添加条件および再生条件を入力し、**Next** をクリックします。

↓

サンプル名を入力します。**Next** をクリックします。

↓

コントロールサンプルを測定する場合は、Run control samples をチェックし、さらに繰り返し測定する場合は、Run control sample(s) every をチェックします。測定頻度は、10 サンプルもしくは 20 サンプル毎が推奨です。コントロールサンプル名を入力し、**Next** をクリックします。

↓

測定の流れが表示されます。**Next** をクリックします。

↓

Sample compartment temperature は 10℃を推奨します。ただし、10℃にすることで沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）
最後に測定の流れを確認する場合は、**Cycle Run List** をクリックします。**Next** をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。**Next** をクリックします。

補足 7-6. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu→Export Positions を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu→Sample Position Import でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。**Start** をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

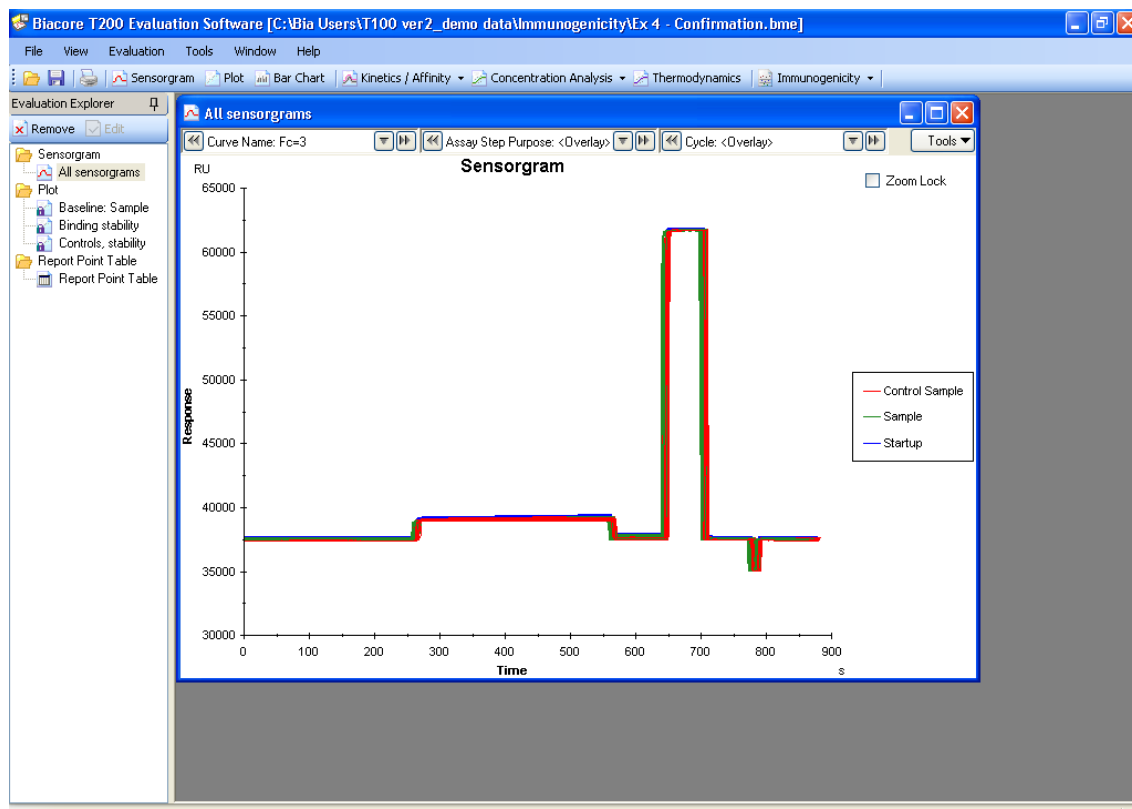
↓

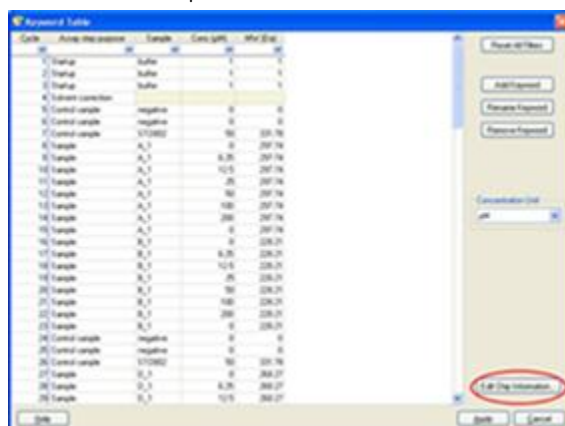
測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

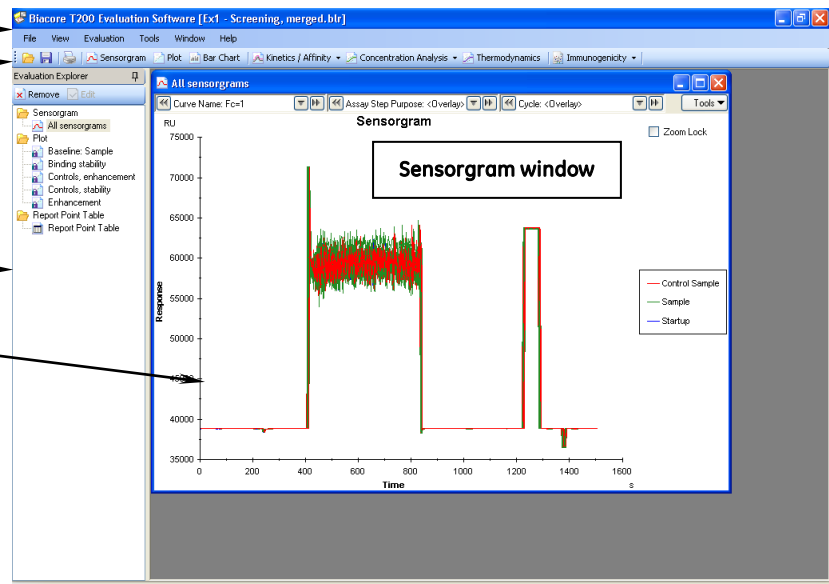
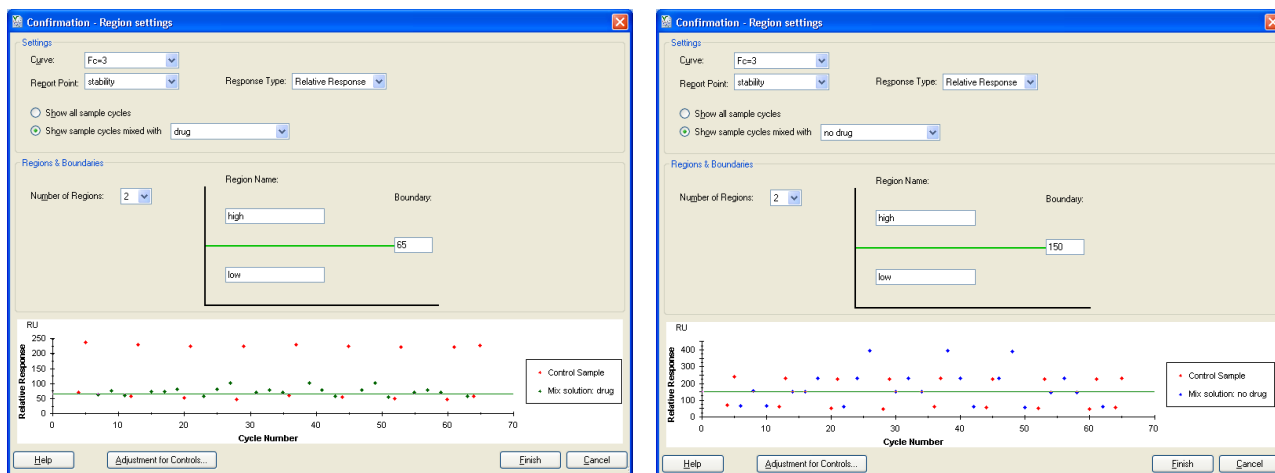
↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

7-2-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

補足 7-7. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table…で変更します。Tools… → Keyword Table…をクリックします。リガンド名の変更は、右下の Edit Chip Information をクリックして変更します。

補足 7-8. 画面の説明

Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Immunogenicity をクリックし、Confirmation を選択します。

ADAs を同定するためには、薬物を混合したときの結合量と、薬物を混合していないときの結合量を比較する必要があります。それぞれのプロットデータを作成して比較をおこないます。
上記画面では、左が薬物混合時のプロットデータ、右が薬物を混合していないときのプロットデータです。それぞれ評価基準を設けます。

Settings

Curve;　評価するフローセルを選択します

Report Point;　2 次抗体を利用して結合量を増幅している場合は、enhance_level
2 次抗体を使用していない場合は、stability を選択します

Show sample cycles mixed with;にて、薬物混合有り無しを選択します

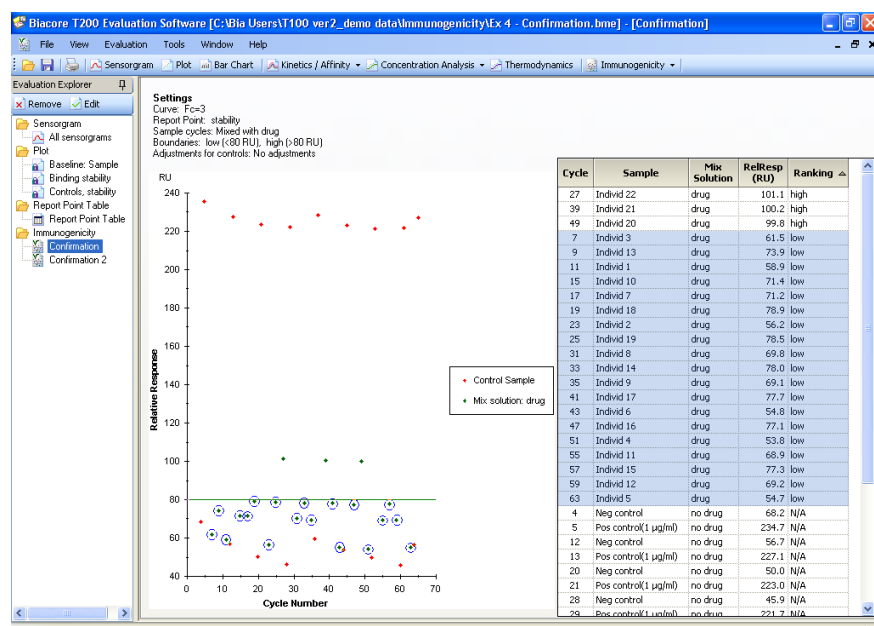
Regions&Boundaries

Number of Regions;　評価基準の数を設定します

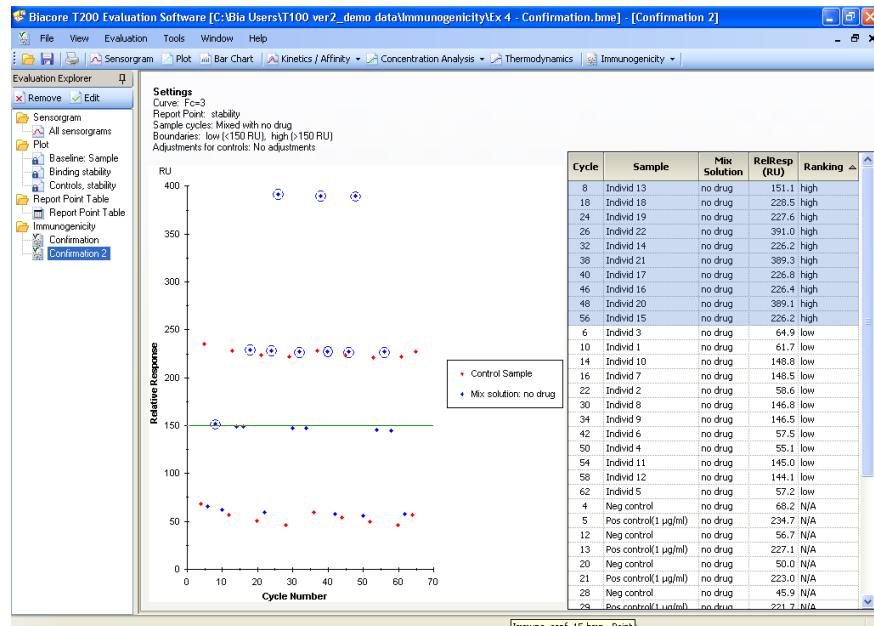
Boundary;　評価基準となる数値を入力します

Region Name;　評価基準に対するカテゴリーごとの名称を入力します
High および low を使用すると便利です

コントロールサンプルによる結合量補正については、補足 7-5 を参照してください。
Finish をクリックします。

↓

評価基準で設定した値にラインが引かれます。同時に、右表には、評価基準に対して属するカテゴリーの名称が、Ranking カラムに入力されます。上記画面は、薬物混合時の結果を表していますので、low と表示されているサンプルが、評価対象となります。

次に、薬物を混合していないときの結合量を評価します。

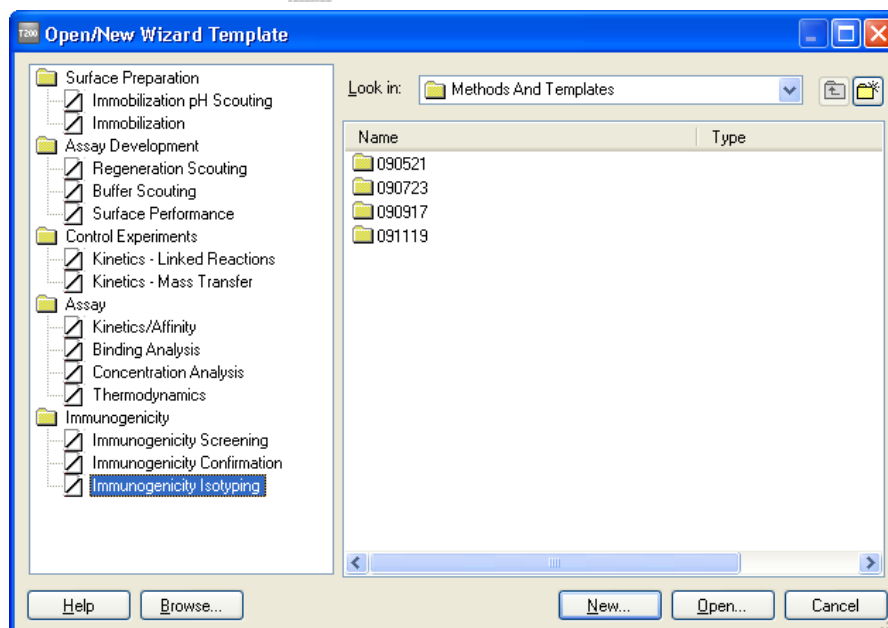
↓

上記画面は、薬物を混合していないときの結果を表しています。high と表示されているサンプルが、評価対象となります。

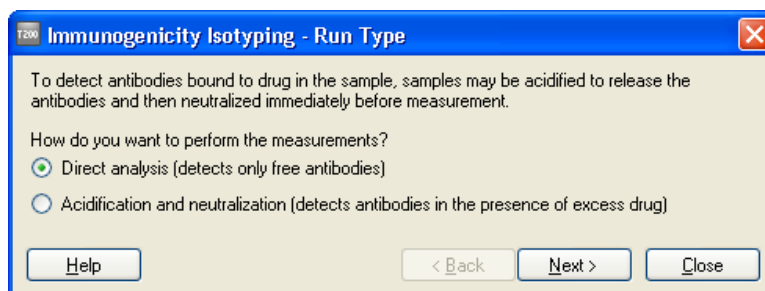
薬物混合時の評価が low、薬物を混合していない時の評価が high のサンプルが、ADAs 陽性サンプルです。

7-3. ADAs のアイソタイプの同定

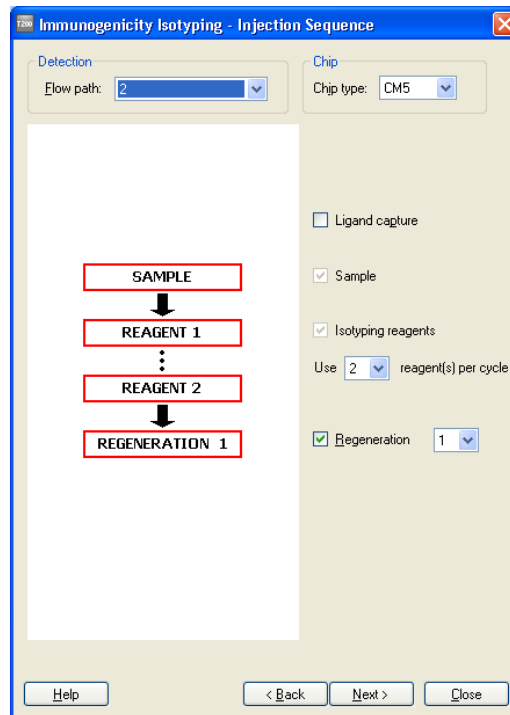
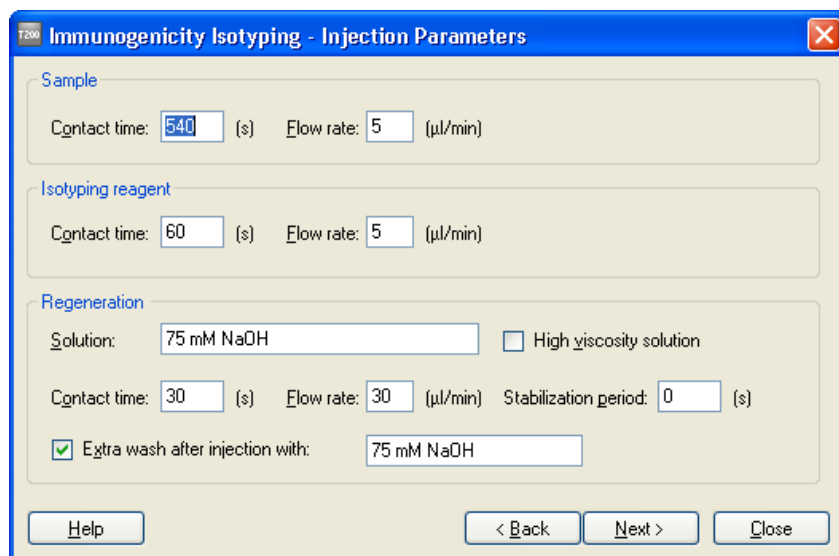
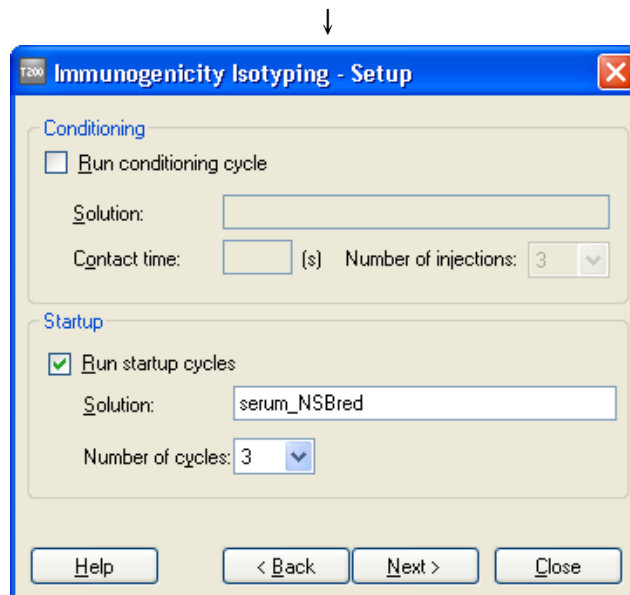
アイソタイプの同定は、サンプル添加後、引き続きアイソタイプを認識する抗体を添加して、結合の有無で判断します。

7-3-1. プログラムの実行（Merged Inject 法の場合）

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の **Run→Wizard** をクリックします。

Immunogenicity → Immunogenicity Isotyping を選択した後、**New** をクリックします。

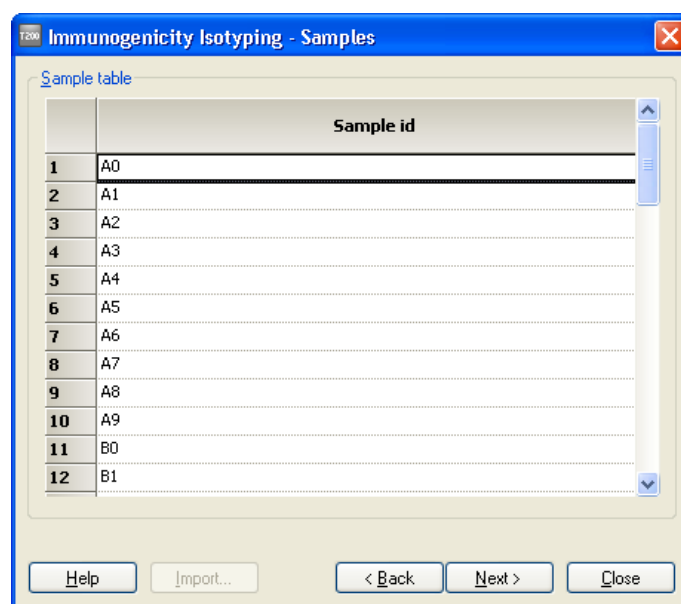
↓

Merged Inject 法を使用する場合は、○**Acidification and neutralization** にチェックします。酸性化および中和をしない場合は、○**Direct analysis** にチェックします。**Next** をクリックします。

以降、○**Direct analysis** を用いて説明します。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Use reagent(s) per cycle カラムから、アイソタイプを同定するための抗体の数を選択します。Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。

Next をクリックします。

↓

ダミーランを設定します。3 回以上の実施を推奨します。**Next** をクリックします。

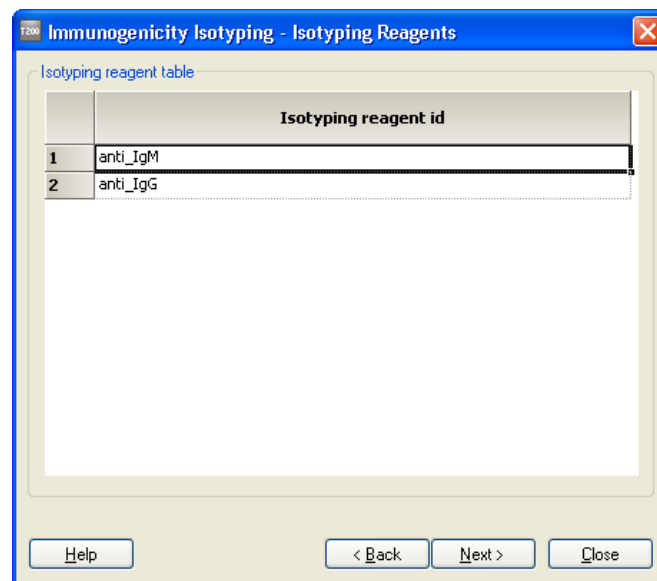
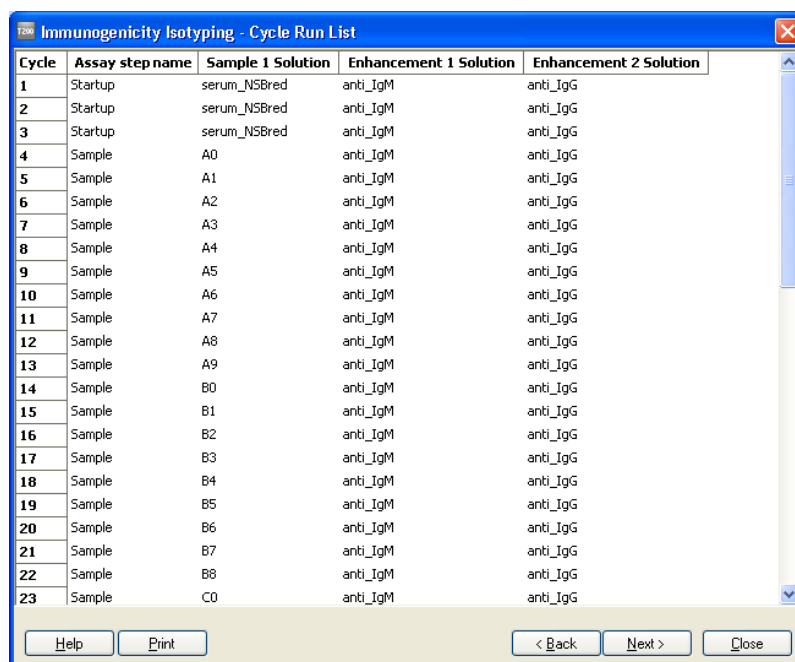
↓

それぞれの項目における溶液名、添加時間、流速を入力します。（Merged Inject 法を最初に選択している場合は、Sample 画面に、Acidification solution カラムと、Neutralization solution カラムが表示されます。）

Next をクリックします。

↓

サンプル名を入力します。

Next をクリックします。

↓

アイソタイプ同定のための抗体名を入力します。

Next をクリックします。

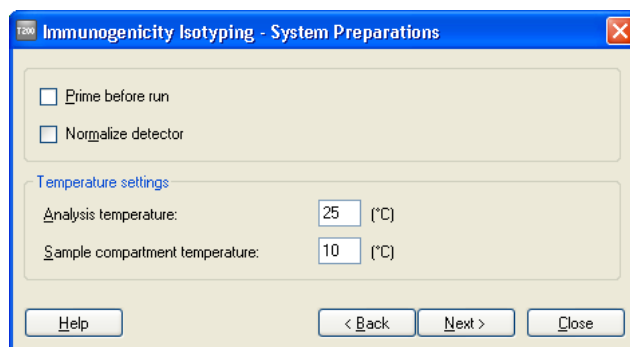
↓

Immunogenicity Isotyping - Cycle Run List

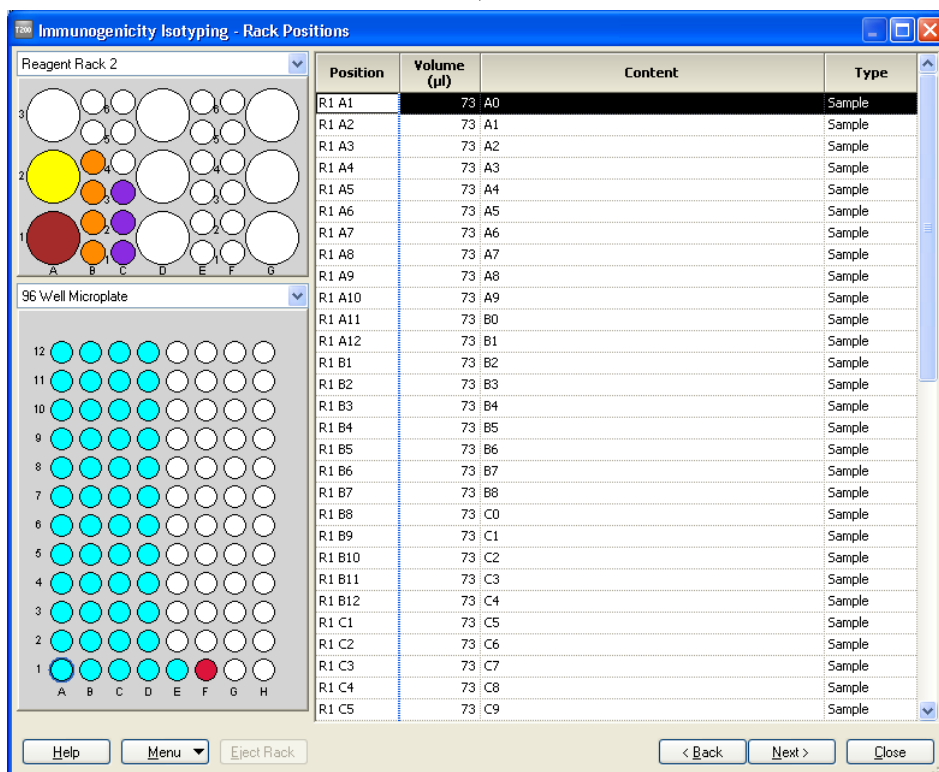
Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Enhancement 1 Solution	Enhancement 2 Solution
1	Startup	serum_NSBred	anti_IgM	anti_IgG
2	Startup	serum_NSBred	anti_IgM	anti_IgG
3	Startup	serum_NSBred	anti_IgM	anti_IgG
4	Sample	A0	anti_IgM	anti_IgG
5	Sample	A1	anti_IgM	anti_IgG
6	Sample	A2	anti_IgM	anti_IgG
7	Sample	A3	anti_IgM	anti_IgG
8	Sample	A4	anti_IgM	anti_IgG
9	Sample	A5	anti_IgM	anti_IgG
10	Sample	A6	anti_IgM	anti_IgG
11	Sample	A7	anti_IgM	anti_IgG
12	Sample	A8	anti_IgM	anti_IgG
13	Sample	A9	anti_IgM	anti_IgG
14	Sample	B0	anti_IgM	anti_IgG
15	Sample	B1	anti_IgM	anti_IgG
16	Sample	B2	anti_IgM	anti_IgG
17	Sample	B3	anti_IgM	anti_IgG
18	Sample	B4	anti_IgM	anti_IgG
19	Sample	B5	anti_IgM	anti_IgG
20	Sample	B6	anti_IgM	anti_IgG
21	Sample	B7	anti_IgM	anti_IgG
22	Sample	B8	anti_IgM	anti_IgG
23	Sample	C0	anti_IgM	anti_IgG

測定の流れが表示されます。

Next をクリックします。

↓

Analysis temperature および Sample compartment temperature を設定します。Analysis temperature および Sample compartment temperature は 10℃を推奨します。ただし、10℃にすることで沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）最後に測定の流れを確認する場合は、**Cycle Run List** をクリックします。

Next をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 7-9. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu→Export Positions を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu→Sample Position Import でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。**Start** をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

7-3-2. プログラムの実行（Double Mix 法の場合）

7-3-1 章に従い、Immunogenicity Isotyping ウィザードを用いてプログラムを作成し、保存します。保存したウィザードを用いて、メソッドによりプログラム内容を変更します。

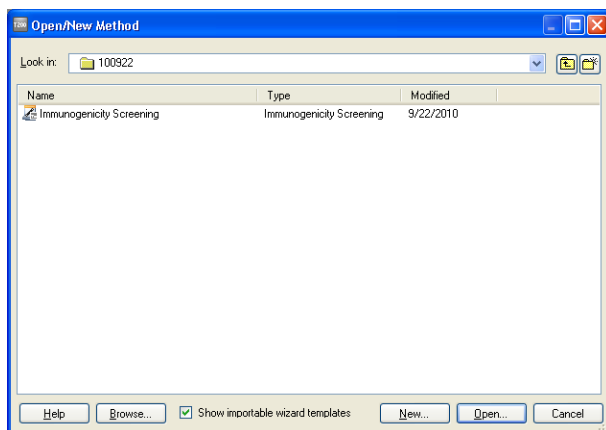
Toolbar の Run Method アイコン（ ）または Menu bar の **Run→Method** をクリックします。

↓

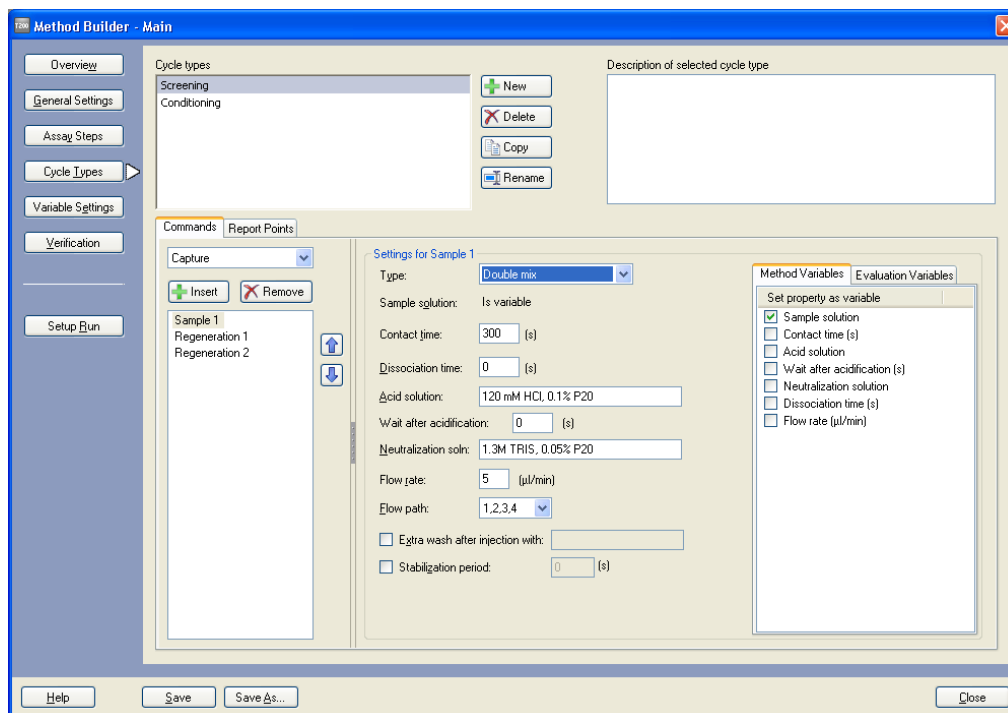
ウィザードを保存したフォルダを指定し、Show importable wizard templates をチェックします。

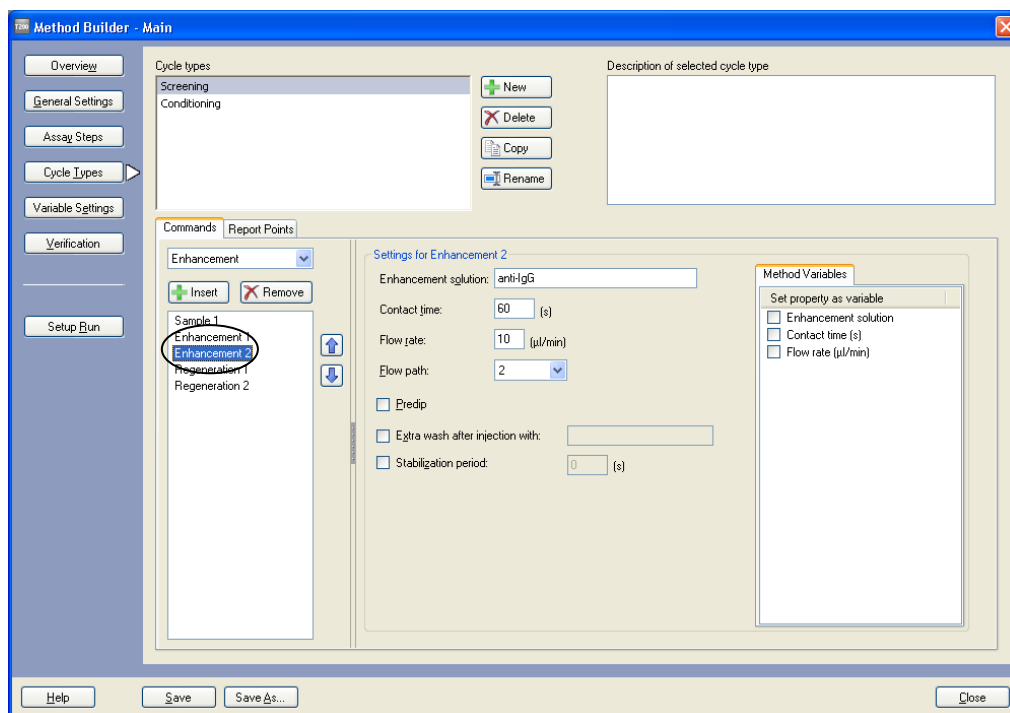
↓

目的のプログラムをハイライトにし、**Open** をクリックします。

↓

Method Builder の Main ダイアログが表示されます。

Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は BiacoreT200 日本語取扱説明書 基本操作編を参照してください。

（Cycle Types）

Sample コマンドの設定を変更します。Type を Double mix に変更し、Acid solution および Neutralization soln の項目に、Double mix 時の推奨条件を入力します。

↓

2 次抗体添加のコマンドを追加します。Enhancement コマンドを 2 次抗体の数だけ追加して、詳細条件を入力してください。

7-3-3. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

補足 7-10. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。
リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。

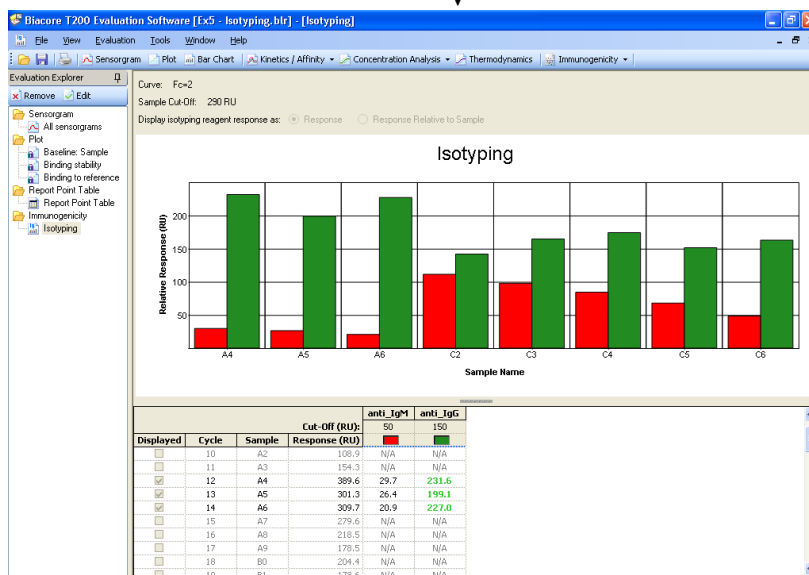
補足 7-11. 画面の説明

Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Curve;　　　　　　目的のフローセルを選択します

Sample Cut-Off;　サンプル結合量の Cut-Off 値を入力します

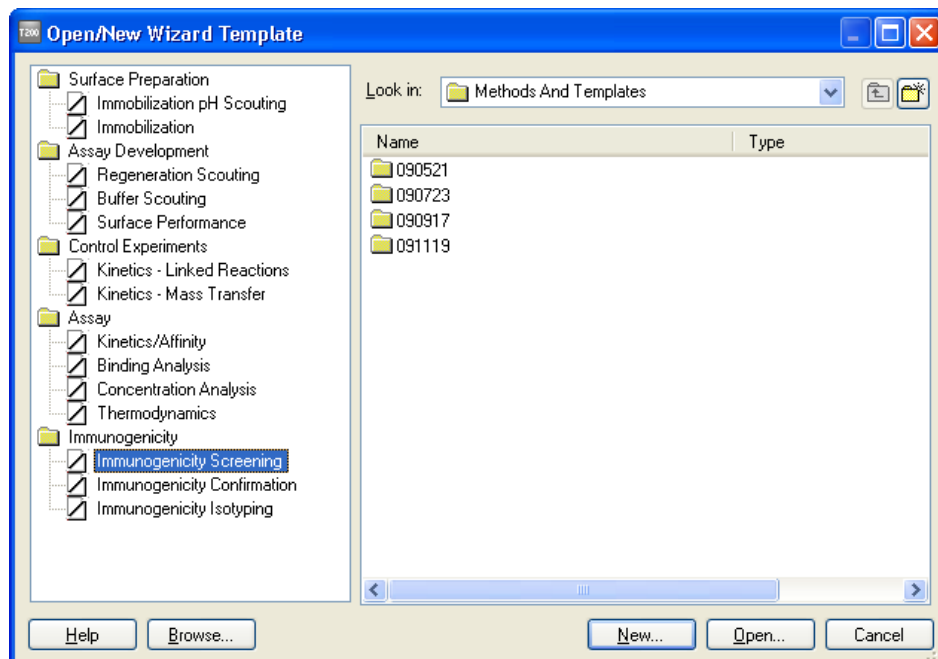
棒グラフは、2 次抗体の結合レスポンスを表示しています。上記画面では、抗 IgM 抗体が赤色、抗 IgG 抗体が緑色で表示されています。それぞれの結合レスポンスにおける Cut-Off 値を画面下のテーブルに入力し、**Finish** をクリックします。

↓

サンプル結合量が Cut-off 値を超えているサンプルが抽出されて、２次抗体の結合量が棒グラフで表示されます。また、２次抗体について Cut-off 値を超えている場合は、テーブルの数値が緑色で表示されます。

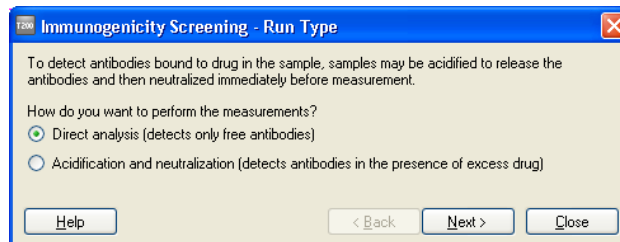
7-4. ADAs の成熟度の確認

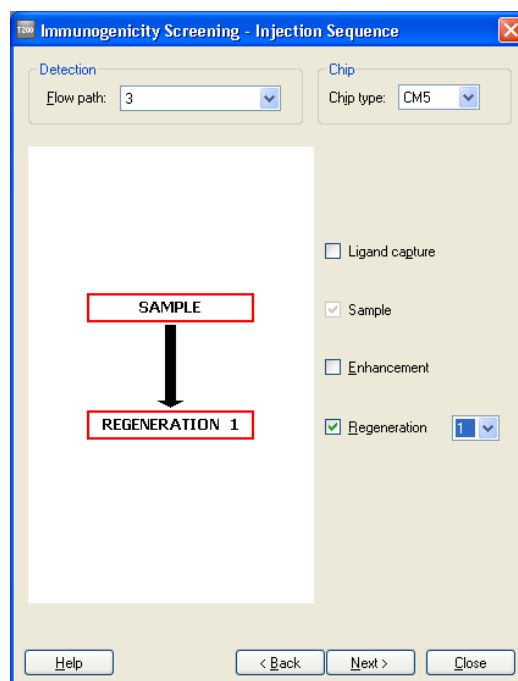
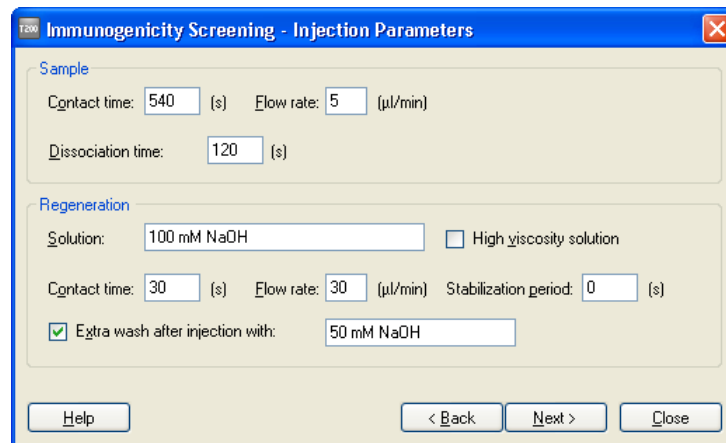
一般的に、ADAs の成熟度の確認方法として、ADAs のアフィニティーを評価します。しかし、ADAs の正確なモル濃度が分からない場合は、カイネティクス解析およびアフィニティー解析は不可能です。このため、濃度情報が反映されない解離領域から、薬物に対する ADAs の結合量の半減期を算出することで、ADAs の成熟度を評価します。

7-4-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の **Run→Wizard** をクリックします。

専用のウィザードがないため、Screening ウィザードを使用します。

Immunogenicity → Immunogenicity Screening を選択した後、**New** をクリックします。

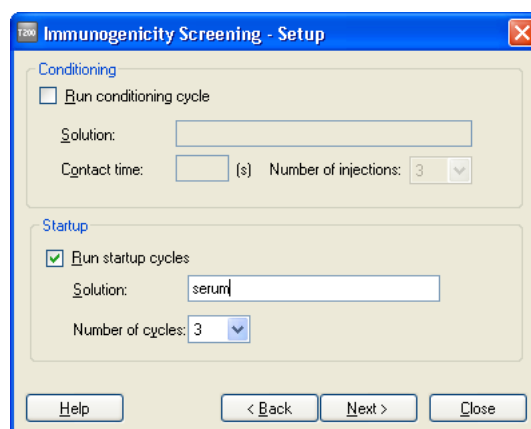
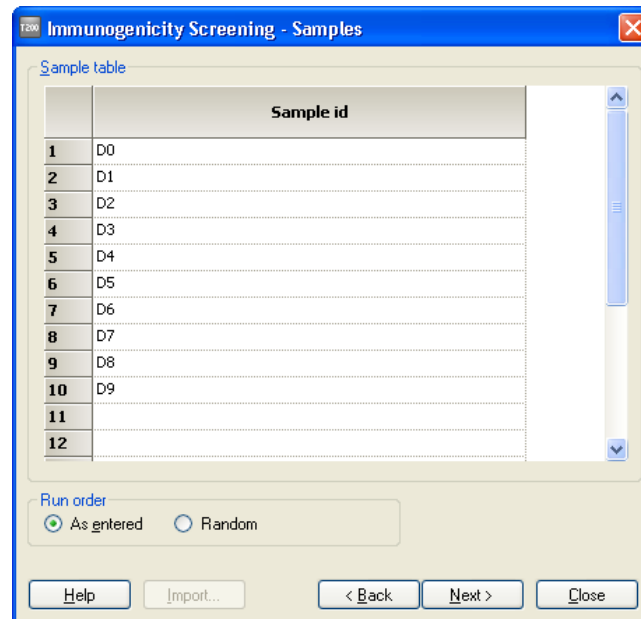
↓

○**Direct analysis** にチェックします。成熟度の評価では、Merged Inject は使用しません。

Next をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Enhancement および Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。**Next** をクリックします。

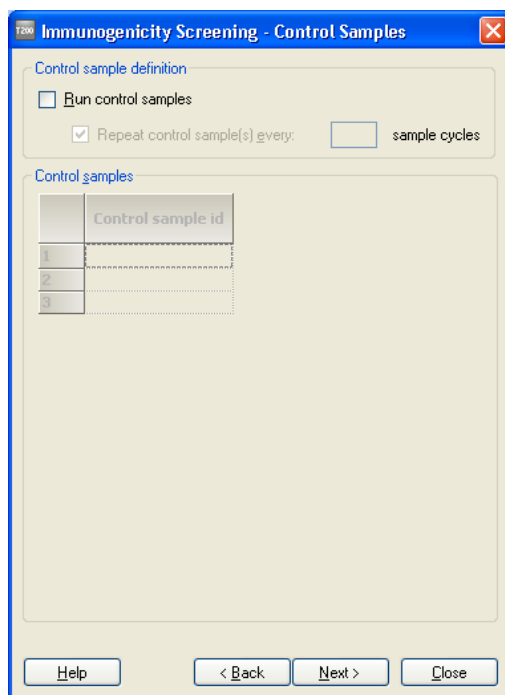
↓

ダミーランを設定します。3 回以上の実施を推奨します。**Next** をクリックします。

↓

それぞれの項目における溶液名、添加時間、流速を入力します。サンプルの解離時間は、解離領域をカーブフィッティングさせるため、120 秒以上設定してください。

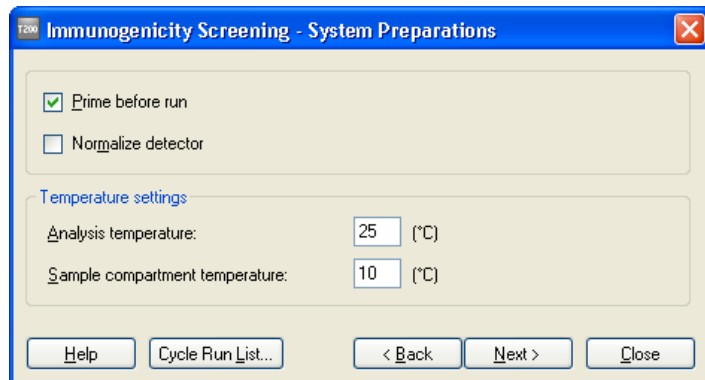
Next をクリックします。

↓

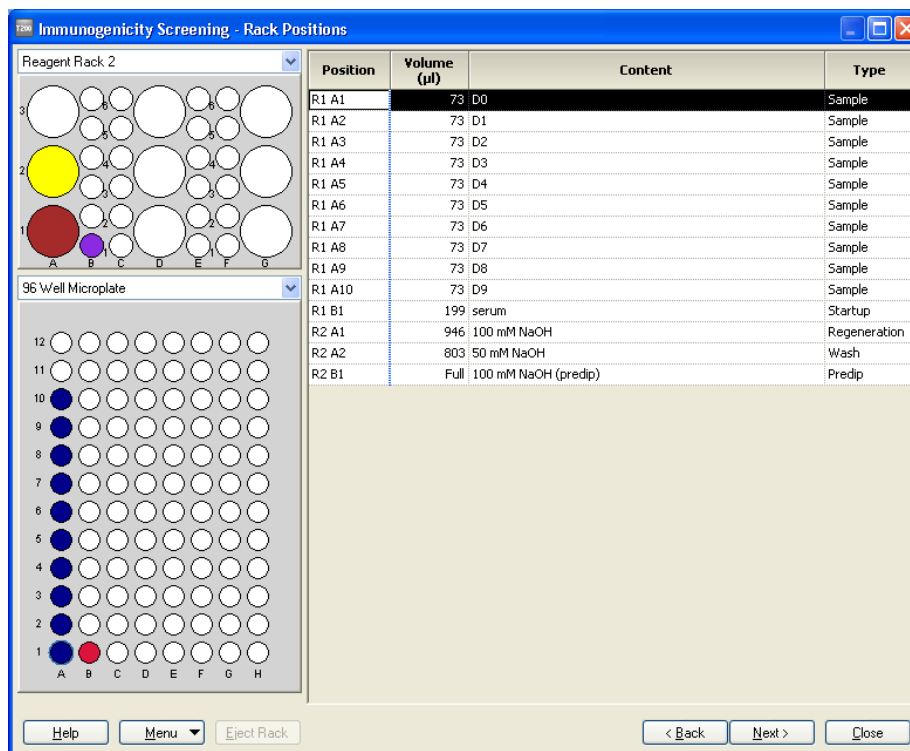
サンプル名を入力します。Run order を設定し、**Next** をクリックします。

↓

コントロールサンプルを測定する場合は、Run control samples をチェックし、さらに繰り返し測定する場合は、Run control sample(s) every をチェックします。

Next をクリックします。

↓

Analysis temperature および Sample compartment temperature の温度を設定します。Sample compartment temperature の温度は 10℃を推奨しますが、10℃で沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）最後に測定の流れを確認する場合は、**Cycle Run List** をクリックします。

Next >をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 7-12. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu→Export Positions を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu→Sample Position Import でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。**Start** をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、**Save as** で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、**Don't Save** を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、**Save** すると測定がスタートします。

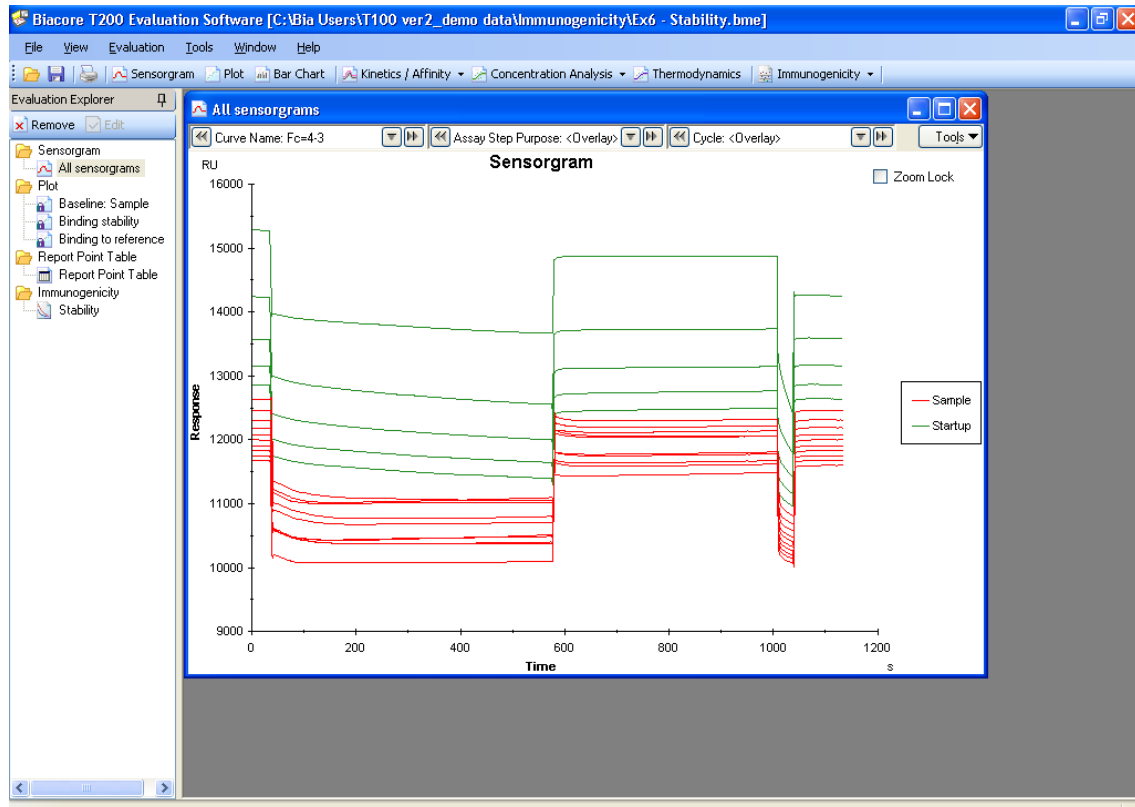
↓

測定終了後、装置は **Standby flow** 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

7-4-2. データ解析

ウィザードもしくはメソッドを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

補足 7-13. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table で変更します。**Tools→Keyword Table** をクリックします。

リガンド名の変更は、右下の **Edit Chip Information** をクリックして変更します。

補足 7-14. 画面の説明

Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Immunogenicity をクリックし、Stability を選択します。

ここでは、結合量ランキングのための設定をおこないます。

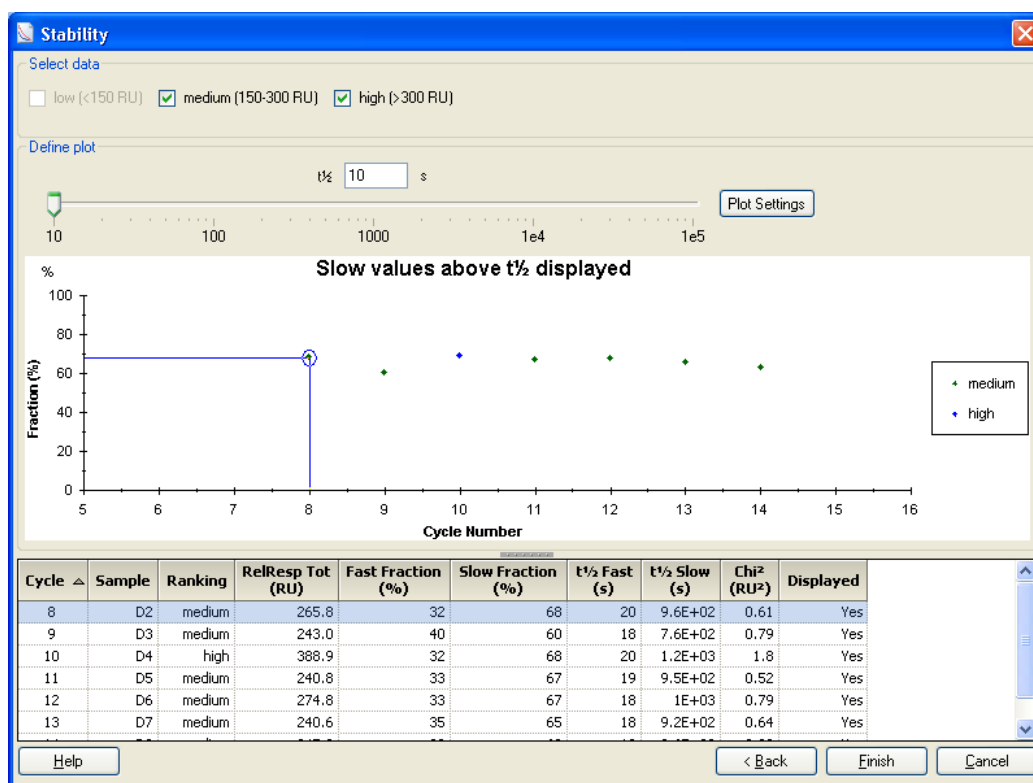
Settings

Curve;	評価するフローセルを選択します
Report Point;	stability を選択します
Response Type;	Relative Response を選択します

Regions&Boundaries

Number of Regions;	評価基準の数を設定します
Boundary;	評価基準となる数値を入力します
Region Name;	評価基準に対するカテゴリーごとの名称を入力します

Next をクリックします。

↓

全画面で設定した評価基準値以上の結合量のサンプルについて、解析結果が画面下のテーブルに表示されます。評価基準の最小値より小さいと評価されたサンプルに関しては、自動的に解析から除外されます。画面上には、各サイクルの Slow Fraction（%）がプロットされています。解析モデルの詳細は、補足 7-15 を参照ください。

RelResp Tot (RU); 解離直後の結合レスポンス
Fast Fraction (%); 全結合抗体に対する解離が速い抗体の割合
Slow Fraction (%); 全結合抗体に対する解離が遅い抗体の割合
$t_{1/2}$ Fast (s); 解離が速い抗体の半減期
$t_{1/2}$ Slow (s); 解離が遅い抗体の半減期

プロットデータ上部のスライダーでは、プロットに表示される Slow Fraction の $t_{1/2}$ の下限値の設定ができます。入力した時間（上記画面の場合 10 秒）より $t_{1/2}$ が長いサンプルが、プロットデータに反映されます。Plot settings で表示方法を変更することが可能です。
Finish をクリックします。

補足 7-15. 解離領域の反応モデル式および半減期の計算方法

免疫応答において産生される抗体は、カイネティクスプロパティが異なる抗体が混在していることが予測されます。しかし、既存の反応モデル式では、混在している個々の抗体を評価することができません。そのため、抗体の成熟度試験では、2 つの独立した解離成分を含んだ解離反応モデル（two-component model）を使用して、解離領域のみを解析することで評価します。

ただし、このモデルは 2 つの明確に異なる抗体が存在することを証明するものではなく、あくまでも、速い解離の抗体、遅い解離の抗体の優位性の観点から、免疫応答を分類するための評価ツールです。

解離領域におけるカーブフィッティングのモデル式は次の通りです。

$$R = R_1 \times e^{-kd1\,(t - t0)} + R_2 \times e^{-kd2\,(t - t0)}$$

R; t (s)における結合レスポンス　k_{d1} および k_{d2}; 解離速度定数

R_1 および R_2; k_{d1} および k_{d2} を求める際の解離領域開始レスポンス

また、$t_{1/2}$（半減期）の計算式は、下記になります。$t_{1/2}$ は、複合体の量（抗体結合量）が 50% 低減するのに必要な時間（秒）です。

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

索引

し

す

せ

そ

ち

ね

は

ひ

ふ

ほ

ま

ゆ

よ

ら

れ

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止

⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

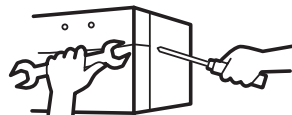
禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。

根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない

ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

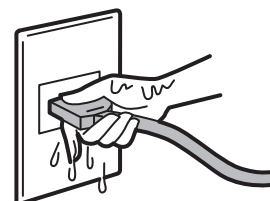
禁 止

設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

ぬれた手で電源プラグを抜き差ししない

禁 止

感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する

プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

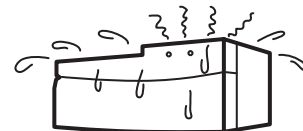
低温室で使用する場合の注意

電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品はOFFにしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）

感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■テクニカルの質問

● **FAQ（製品 Q&A）の検索**

弊社トップページ www.gelifesciences.co.jp より、サポート> FAQ（製品 Q&A）をクリック

● **TEL：03-5331-9336**

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

クロマトグラフィー関連製品　：❶
ビアコア・MicroCal 関連製品　：❷
電気泳動関連製品　：❸
その他製品　：❹

● **FAX：03-5331-9370**

● **e-mail：Tech-JP@ge.com**

注）主な製品マニュアルや製品 Q&A は弊社 Web サイトで公開していますのであわせてご活用ください。

■機器アフターサービス

TEL：03-5331-9315　FAX：03-5331-9349

■納期／在庫お問合せ

TEL：03-5331-9330　FAX：03-5331-9324

注）お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。
注）アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

www.gelifesciences.co.jp

e-mail で最新情報をお届けしています。お申込みは上記 Web サイト左下の「メールマガジン購読」から。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2008
認証取得

取扱店